

C1 INAKTIVATOR

Chromogene Aktivitätsmessung
und klinische Ergebnisse

Wolfgang Penker

Duss
München
1984

Aus der Hämostaseologischen Abteilung
der Medizinischen Klinik, Innenstadt,
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

C 1 I N A K T I V A T O R

Chromogene Aktivitätsmessung und klinische Ergebnisse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Penker

aus

Moosburg

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. W. Schramm

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 1984

Abkürzungsverzeichnis

AT III	Antithrombin III
ATEE	Acetyl-Tyrosin-Äthylester
chromog.	chromogen
C1-INA	C1-Inaktivator = C1-Esterase-Inaktivator = C1-Inhibitor
C1-INA-Akt.	C1-Inaktivator-Aktivität (bestimmt mit chromogenem Substrat)
C1-INA-Konz.	C1-Inaktivator-Konzentration (bestimmt mit der Immunelektrophorese nach Laurell)
C1-INA-chr.	C1-Inaktivator-chromogen = C1-INA-Akt.
C1-INA-imm.	C1-Inaktivator-immunologisch = C1-INA-Konz.
DIC	Disseminierte intravaskuläre Gerinnung (Disseminated intravascular coagulation)
Diff.	Differenz zwischen C1-INA-Konzentration und C1-INA-Aktivität
FFP	Fresh Frozen Plasma
HMW-Kininogen	High Molecular Weight-Kininogen
immunol.	immunologisch
KHE	Koronare Herzerkrankung
PK	Praekallikrein
pNA	para - Nitroanilin
PPSB	Prothrombinkomplex (4-Faktorenkonzentrat)
PTT	partielle Thromboplastinzeit

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Aufgabenstellung	1
2.	Beschreibung des C1-Inaktivators	3
2.1.	Struktur und Bedeutung des C1-Inaktivators	3
2.2.	Wirkung des C1-Inaktivators	5
3.	Bisherige Bestimmungsmethoden	6
3.1.	Aktivitätsbestimmung mit N-Acetyl-Tyrosin-Äthylester	6
3.2.	Die quantitative Immunelektrophorese nach Laurell	11
4.	Prinzip und Durchführung chromogener Bestimmungen	13
4.1.	Geschichte und allgemeine Grundlagen	13
4.2.	Anwendung der chromogenen Bestimmung auf C1-Inaktivator	16
4.2.1.	Bestimmung eines spezifischen Substrates	16
4.2.2.	Materialien zur C1-Inaktivatorbestimmung	18
4.2.3.	Geräte zur C1-Inaktivatorbestimmung	19
4.2.4.	Versuchsablauf zur C1-Inaktivatorbestimmung	19
4.2.5.	Erstellen einer Eichkurve	23
4.2.6.	Zeit- und Arbeitsaufwand	25
4.3.	Methodische Ergebnisse und Normalwerte der C1-Inaktivatorbestimmung	25

	Seite
4.3.1. Normalwerte	25
4.3.2. Qualitätskontrolle	28
4.3.3. Stabilität des C1-Inaktivators	31
5. Vergleich der chromogenen Bestimmung mit der immunologischen Technik nach Laurell	33
5.1. Vergleich der Standardkurven und der Normalbereiche	33
5.2. Differenzen bei Normalpersonen	34
5.3. Differenzen bei Intensivpatienten	36
6. C1-INA bei verschiedenen thrombophilen Diathesen und allgemeinen schweren Erkrankungen	40
6.1. C1-Inaktivator bei Lebererkrankungen und gastrointestinalen Blutungen	41
6.1.1. Leberzirrhose ohne Blutung	41
6.1.2. Leberzirrhose mit gastrointestinaler Blutung	42
6.1.3. Gastrointestinale Blutung ohne Leberzirrhose	43
6.1.4. Kasuistik von 3 Patienten mit Lebererkrankung	50
6.2. C1-Inaktivator bei Sepsis	56
6.2.1. Fälle mit positiver Blutkultur	56
6.2.2. Kasuistik eines Patienten mit Sepsis	58
6.2.3. Fälle ohne positive Blutkultur	60

	Seite
6.3. C1-Inaktivator bei Pneumonie	62
6.3.1. Kasuistik von 2 Patienten mit schwerer Pneumonie	64
6.4. C1-Inaktivator bei Allgemeininfektionen, unklarem Fieber und Entzündungen	68
6.5. C1-INA bei Lungenembolie	70
6.5.1. Kasuistik von 2 Patienten mit akuter, fulminanter Lungenembolie	72
6.6. C1-Inaktivator bei akuter Pankreatitis	76
6.6.1. Kasuistik eines Patienten mit akuter Pankreatitis	77
6.7. C1-Inaktivator bei Malaria	79
6.8. C1-Inaktivator bei Typhus abdominalis	80
6.9. C1-Inaktivator bei Malignom	81
6.10. C1-Inaktivator bei Herzerkrankungen	82
7. C1-Inaktivator bei systemischen Thrombolyse	83
8. C1-Inaktivator bei Hämo- separation	87
9. Prae- kallikrein	91
9.1. Bestimmungsmethode für Prae- kallikrein	91
9.1.1. Materialien zur Prae- kallikreinbestimmung	91
9.1.2. Vorgangsbeschreibung	92

	Seite
9.1.3. Erstellen einer Eichkurve	93
9.2. Prinzip und Problematik der Praekallikreinbestimmung	95
9.3. Qualitätskontrolle	99
9.4. Stabilität des Praekallikreingehaltes	101
9.5. Ergebnisse der Praekallikreinuntersuchung	102
9.5.1. Normalpersonen	102
9.5.2. Intensivpatienten	103
9.6. Vergleich von Praekallikrein- und F XII - Konzentrationen	104
10. Diskussion der Ergebnisse	109
10.1. Diskussion der neuen Methode	109
10.2. Diskussion der auftretenden Unterschiede zwischen chromogenem und immunologischem Nachweis	110
10.3. Diskussion der C1-Inaktivator-Konzentrationen und Aktivitäten bei Intensivpatienten mit:	112
10.3.1. Lebererkrankungen und gastrointestinalen Blutungen	112
10.3.2. Sepsis, Infektionen und allg. Entzündungen	116
10.3.3. Lungenembolien	121
10.3.4. Malignomerkrankungen	122

	Seite
10.4. Diskussion der Ergebnisse zur Bestimmung der Praekallikreinaktivität	124
10.4.1. Diskussion der Methode	124
10.4.2. Diskussion der Ergebnisse bei Normalpersonen und Intensivpatienten	125
11. Zusammenfassung	127
12. Literatur	131

1. Aufgabenstellung

Die Bestimmung der C1-Inaktivator-Aktivität war bisher an aufwendige Methoden gebunden. Diese Arbeit stellt ein neues chromogenes Verfahren vor, mit dem es möglich ist, diesen wichtigen Inhibitor der Vorphasengerinnung und verschiedener anderer Enzymsysteme, wesentlich einfacher und schneller zu bestimmen. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, das neue Verfahren zu testen, seine Durchführbarkeit in einem klinischen Laboratorium zu überprüfen und die Anwendbarkeit der Ergebnisse auf ein Patientenkollektiv zu relativieren. Dieses Patientenkollektiv, an dem versucht werden sollte, erste klinische Ergebnisse der C1-Inhibitor-Aktivität, bestimmt nach der neuen Methode, zu sammeln, bestand hauptsächlich aus Patienten einer Intensivstation, da hier starke Einflüsse auf das Hämostasesystem zu erwarten waren.

Ein weiteres Problem, zu dessen Klärung diese Arbeit ihren Beitrag leisten sollte, sind die z.T. erheblichen Unterschiede zwischen Plasmakonzentration und Plasmaaktivitäten des C1-Inhibitors, wie sie in der Literatur immer wieder vorkommen. Diese Differenzen galt es, im direkten Vergleich der neuen chromogenen Aktivitätsmessung zur immunologischen Konzentrationsmessung nach Laurell, in ihrer Tatsache zu belegen und zu versuchen, ihre klinische Bedeutung zu interpretieren.

Festzustellen bleibt noch, daß das vorliegende Patientenkollektiv für eine statistische Auswertung einzelner Krankheitsgruppen nicht ausreicht. Dies war jedoch auch nicht die Zielsetzung dieser Arbeit. Vielmehr galt es, stichprobenhaft bei verschiedenen Krankheitsbildern nachzuforschen, um eventuelle positive oder negative Ergebnisse als Grundlage für spätere intensivere Studien an einzelnen Krankheitsgruppen vorzulegen.

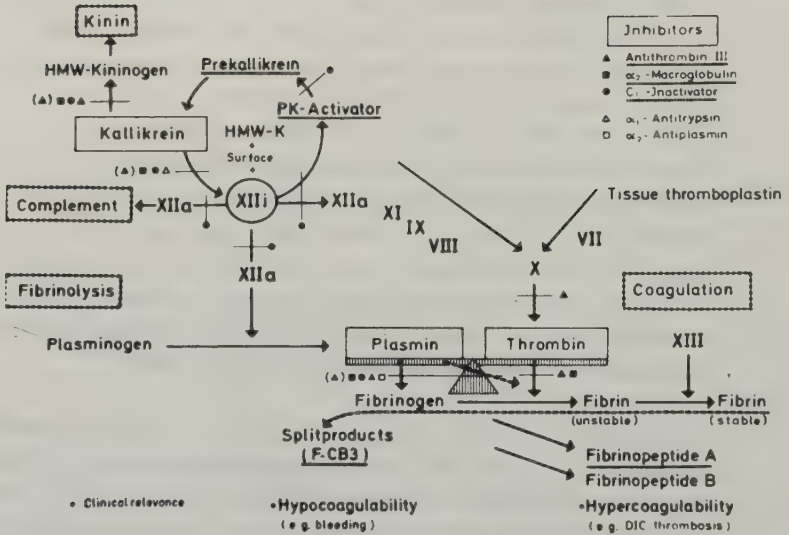


Abb. 2.1.1.:

Darstellung des Blutgerinnungssystems mit den Interaktionsmöglichkeiten zu anderen Regelkreisen. Zu beachten sind die vielfältigen Angriffspunkte der verschiedenen Inhibitoren, so auch des C1-Inaktivators.

2. Beschreibung des C1-Inaktivators

2.1. Struktur und Bedeutung des C1-Inaktivators

Der C1-Inaktivator ist ein alpha-2-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 104 000. Dabei existieren 2 verschiedene Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 105 000 - Anteil 85 % der Gesamtmenge - und einem Molekulargewicht von 96 000 - Anteil 15 % der Gesamtmenge (31). Sein Kohlenhydratanteil beträgt 35 %, sein Neuraminsäureanteil 15 % (33). In der Klinik spielt ein familiär auftretender Mangel an C1-INA eine wichtige Rolle: das hereditäre angioneurotische Ödem (27,71). Neben dem Mangel kann auch ein funktionell inaktiver C1-INA das klinische Erscheinungsbild hervorrufen. Die Pathogenese dieser Krankheit ist noch nicht restlos geklärt und soll im Rahmen dieser Arbeit auch nicht weiter interessieren.

Eine weitere wichtige Stellung beschreibt der C1-INA als Inhibitor verschiedener Proteasen des Hämostase-, Complement- und Kinin-Systems. Die Abb. 2.1.1. zeigt in einem Schema die möglichen Interaktionen verschiedener Inhibitoren im System der Hämostase. Es wird deutlich, daß der Hauptangriffspunkt des C1-INA in der Vorphasengerinnung liegt, dessen zentralen Punkt der Hageman-Faktor (F XII) darstellt.

Gerade dieser F XII scheint für die Wirkung des C1-INA eine sehr entscheidende Rolle zu spielen. Wie Abb. 2.1.2. stark vereinfacht zeigt, werden durch den aktivierten F XII (F XII a) verschiedene, kaskadenartig ablaufende Systeme in Gang gebracht.

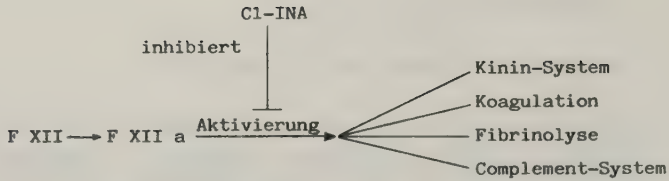


Abb. 2.1.2.

Darstellung der Aktivierung verschiedener Enzymsysteme durch aktivierten F XII (F XII a) und dessen Inaktivierung durch C1-INA.

Der C1-INA ist nun in der Lage, durch Interaktion mit den aktivierten Hageman-Fragmenten, diesen Ablauf der verschiedenen Kaskaden bereits vor Beginn zu verhindern (75). Neben der indirekten Wirkung auf diese Systeme, hemmt der C1-INA auch direkt verschiedene Zwischenprodukte der einzelnen Kaskaden.

Dazu gehören:

- im Complement - System:

C-1s und, wenn auch erheblich geringer, C-1r; beides Unterkomponenten der C-1-Esterase (7). Damit ergibt sich eine Hemmung der hämolytischen (49) und der estero-lytischen (50) Aktivität der C1-Esterase

- Hämostase - System:

F XII a, F XI a (73,2,21)

- im Fibrinolyse - System:

Plasmin (35) und Plasminogenaktivatoren, z. B. Urokinase (60)

- im Kallikrein-Kinin-System:

Plasmakallikrein, Präkallikrein-Aktivator (23)

Besonders ausgeprägt ist die Hemmwirkung des C1-INA auf Plasmakallikrein und Plasmin, die die Interaktion mit C-1s um das 18-fache, bzw. 10-fache überschreitet (60).

Überhaupt scheint die Inhibitionswirkung des Plasmas auf Kallikrein wohl hauptsächlich auf dem Gehalt an C1-INA zu beruhen (60).

2.2. Wirkung des C1-Inaktivators

Zur Frage, wie der C1-INA diese Inhibition bewerkstelligt, gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

- a) Bildung eines inaktiven Komplexes zwischen Protease und C1-INA, analog der C-1s - Inaktivierung (7).
- b) Proteolytische Spaltung einer aktiven Protease und somit Überführung in einen inaktiven Zustand.

Während es bei a) zu einem Verbrauch des C1-INA kommt, ist dies bei b), analog einer enzymatischen Reaktion, nicht der Fall.

In der Tat fanden Schreiber et alii (75) bei der Inaktivierung der 80 000 mol - Fragmente des F XII in vitro keinen Verbrauch an C1-INA.

3. Bisherige Bestimmungsmethoden

3.1. Aktivitätsbestimmung mit N-Acetyl-Tyrosin-Äthylester

Levy und Lepow gaben bereits 1959 eine Methode zur Aktivitätsbestimmung, sowohl der C1-Esterase, als auch des C1-Inaktivators an. Sie benützten dazu die Fähigkeit der C1-Esterase, gewisse synthetische Aminosäureester zu hydrolysieren, v.a. den N-Acetyl-L-Tyrosin-Äthylester (ATEE). Der Test, der an sich sehr aufwendig ist (50), entspricht einer Endpunktbestimmung. Dabei wird nach 15 Minuten Reaktionszeit die durch estero-lytische Spaltung freigesetzte Säure mittels 0,05 N NaOH und einem Tropfen 1%-iger alkoholischer Phenolphthaleinlösung als Indikator austitriert. Der Unterschied zwischen Endwert und Ausgangswert ergibt die Esterase-Aktivität, ausgedrückt in " units (U) ", wobei 1 U diejenige Menge an Enzymaktivität ist, die eine äquivalente Menge an ATEE zur Titration von 0,01 ml einer 0,05 N NaOH hydrolysiert. Gestoppt wird die Freisetzungsreaktion nach 15 Minuten mit 37 %igem Formaldehyd.

Inkubiert man nun vorher eine Testlösung mit einer definierten C1-Esterase-Menge und bestimmt daraufhin die verbliebene Restaktivität, so kann man über Referenzkurven, die mit Normalplasmen erstellt werden, den ursprünglichen Gehalt der Testlösung an C1-INA berechnen.

Grundlage für die Tests und deren Auswertung ist die lineare und stöchiometrische Hemmung der C1-Esterase durch normales menschliches Plasma. Abb. 3.1.1. und 3.1.2. machen dies deutlich.

Esterase zugegeben (U/ml)	16,4	23,8	32,8	36,9	41,0
Esterase gehemmt (U/ml)	11,4	10,8	10,7	10,8	12,6

Abb. 3.1.1.:

Stöchiometrie der Interaktion von Seruminhibitor mit der C1-Esterase. Die Serummenge, als Inhibitor ist konstant.

(Abb. nach 12, leicht abgewandelt)

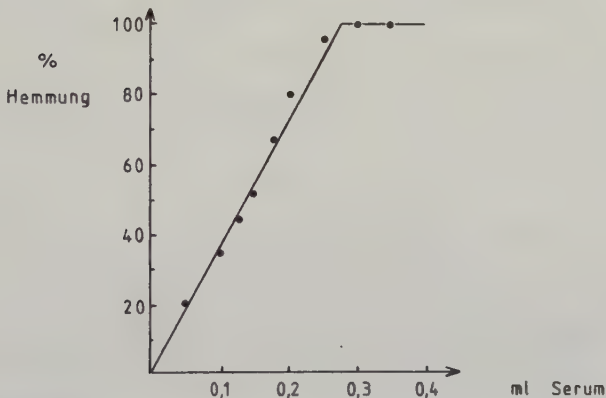


Abb. 3.1.2.:

Hemmung menschlicher C1-Esterase (38 U/ml) durch menschliches Normalplasma. (nach 12)

Schena et alii entwickelten, ausgehend von der Methode nach Levy und Lepow, eine kinetische Testmethode. Auch hier gilt als Grundlage die esterolytische Spaltung von ATEE (70).

Schena mißt jedoch nicht die Menge an freigesetzter Säure nach einer definierten Zeiteinheit, sondern er bestimmt die Geschwindigkeit, mit der die Säure, bzw. die H^+ -Ionen, freigesetzt werden. Man gibt dabei zu einer Testlösung, die neben

einem bestimmten Ausgangs-pH den Inhibitor und ATEE enthält, eine definierte Menge an Cl-Esterase und mißt den sich ändernden pH mit einem pH-Meter während der ersten Minuten.

Abb. 3.1.3. zeigt, daß sich hierbei eine lineare Beziehung zwischen der Reaktionszeit und der H^+ -Ionenfreisetzung ergibt. Dabei ist der Neigungswinkel, sprich die Geschwindigkeit der Reaktion, abhängig von der vorhandenen Inhibitormenge und der zugegebenen Cl-Esterase-Konzentration.

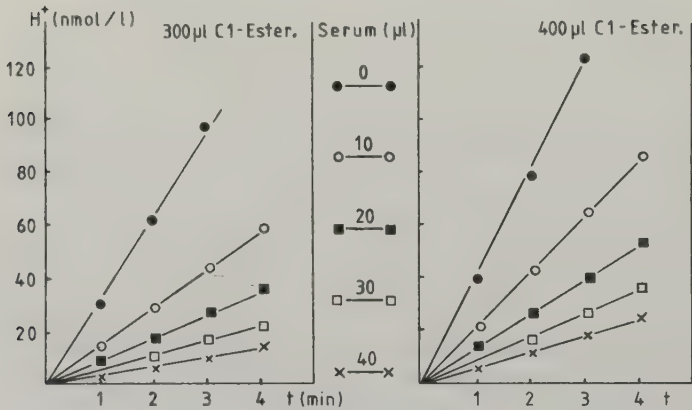


Abb. 3.1.3.:

Hydrolyse von ATEE durch Cl-Esterase (300µl bzw. 400µl) als Funktion der Zeit, wobei verschiedene Mengen von Normalplasma, sprich Cl-Inhibitor, zugegeben wurden (0µl, 10µl, 20µl, 30µl, 40µl). (nach 70)

Die Esterase-Aktivität ist bei diesem Test definiert als 1 U gleich der Menge an Cl-Esterase, die 1µmol Acetyl-Tyrosine pro Minute freisetzt.

1 U Inhibitor hemmt, wie bei Levy, Lepow, 10 U Cl-Esterase.

Smith and Tompson beschreiben ein Testverfahren, das zwar im Prinzip der Durchführung und Auswertung dem Verfahren nach Schena entspricht, die Darstellung der pH - Änderung führen sie jedoch auf wesentlich elegantere Art und Weise durch (79). Die Änderung des pH in der Zeiteinheit wird durch den Farbstoff Bromothymolblau angezeigt, der bei Änderung der H^+ -Ionen-Konzentration sein Lichtabsorptionsverhalten bei 434 nm ändert. Führt man den Versuch in einem Spektralphotometer durch, an dem ein Aufzeichnungsgerät angeschlossen ist, so erhält man während der ersten 3 Minuten der Reaktion einen linearen Graphen, dessen Neigungswinkel wiederum vom Gehalt an C1-INA und der C1-Esterase abhängig ist.

Anhand der Proportionalität der Kurven zu den nicht inhibierten Anteilen der C1-Esterase, läßt sich die Inhibitor-Aktivität im prozentualen Verhältnis zu einem Normalplasma errechnen (79).

Harpel benützt für seine C1-INA-Bestimmung das Substrat N-alpha-Acetyl-L-Lysin-Methylester (ALMe) (29).

Dieses Substrat wird durch CIs gespalten, wobei die Inhibierung dieses Reaktionsablaufes den Gehalt an C1-INA des Plasmas widerspiegelt. Während des etwas aufwendigen Testablaufes werden zur Plasmaprobe bestimmte Mengen an Pufferlösungen, Perchlorsäure, 2%ige $KMnO_4$ -Lösung, 10%ige Na_2SO_3 -Lösung und schließlich eine spezielle (29) chromotrope Säurelösung zugegeben. Die Optische Dichte der Lösung - bestimmt durch das freigesetzte Methanol - wird zu bestimmten Zeitpunkten in einem Spektralphotometer bei 580 nm gemessen. Anhand einer speziellen Formel (29) kann dann der C1-INA-Aktivitätsgehalt der Probe abgeschätzt werden.

Die Reaktion ist bis zur Inhibierung von 60% linear. Proben mit höherer Konzentration müssen entsprechend vorbehandelt werden.

Das Ergebnis ist eine Aktivität an C1-INA, angegeben in Units (U), wobei per definitionem 1 U C1-INA 10 U C1s inaktiviert. 1 U C1s ist diejenige Menge an Enzym, die pro Stunde 1 Mikromol Methanol freisetzt.

Gigli verwendet ein völlig anderes Verfahren zur C1-INA-Bestimmung. Sie benützt die Fähigkeit des C1-INA, die hämolytische Aktivität des C1a zu hemmen. Das Verfahren ist eine stöchiometrische Titrierung und vollzieht sich in vier Schritten (24). Im ersten Schritt werden eine definierte Menge an C1a und die Probe mit der zu bestimmenden Menge an C1-INA inkubiert. Dabei wird eine gewisse Menge an C1a durch Komplexbildung mit C1-INA inaktiviert. Im zweiten Schritt wird zu der noch verbleibenden Aktivität an C1a ein präparierter Komplex aus Erythrocyten-Antikörper-C4 gegeben. Es bildet sich der Komplex Ery-AK-C1a-C4. Durch Zugabe von isoliertem C2 entsteht die Verbindung Ery-AK-C1a-C4-C2. Im letzten Schritt werden die noch fehlenden Komponenten des Complementsystems hinzugefügt und die Hämolyse der Erythrozyten kann ablaufen. Nach einer Stunde werden die Zellen abzentrifugiert und das freie Hämoglobin in der Lösung bei 414 nm im Spektralphotometer gemessen. Leerproben, Spontanhämolysen und 100% Hämolysenmessungen sind als Vergleichswert notwendig. Über ein System von Berechnungen und Formeln (24) ergibt sich der C1-INA-Gehalt der ursprünglichen Probe. Er war umso höher, je geringer die Hämolyse ausfiel. Ein Problem dieser Methode ist die Tatsache, daß in diesem Meßsystem eine definierte Menge an C1a vorhanden sein muß. Aus diesem Grund ist es notwendig, den C1-Gehalt der Plasmaprobe vorher, z.B. durch Präzipitation zu extrahieren. Wiederum inaktiviert 1 U C1-INA 10 U C1-Esterase. Spezifität und Sensitivität dieses Testes sollen sehr hoch sein.

3.2. Die quantitative Immunelektrophorese nach Laurell

Im Gegensatz zu den beschriebenen Aktivitätsmessungen werden bei dieser Methode Proteinkonzentrationen bestimmt, unabhängig davon, ob sie biologisch aktiv sind oder nicht. Der quantitativen Immunelektrophorese gingen qualitative Methoden voraus, wie etwa die Technik nach Grabar und Williams (26), bei der nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (Antigene) es in einem Diffusionsverfahren zu einer Präcipitationslinie an der Berührungsfläche zwischen Antigen und Antikörper kommt. Die Antigen-Elektrophorese in einem antikörperhaltigen Gel wurde nachfolgend von mehreren Forschern mit schnelleren und besseren qualitativen Ergebnissen durchgeführt (Ressler, N. (66), Bussard, A. (11), Laurell, C.-B. (48)).

Laurell hat die Methode der Immunelektrophorese schließlich standardisiert und in quantitativ auswertbarer Form vorgestellt (47).

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß ein gleichmäßig verteiltes, monospezifische Antikörper enthaltendes Gel, an dem ein möglichst homogenes elektrisches Feld angelegt wird, von den zu bestimmenden Antigenen in definierter Richtung durchwandert wird. Dabei bilden sich entlang der Wegstrecke Antigen-Antikörper - Komplexe in Form von Präzipitationslinien, deren Höhe von der Konzentration der Antigene abhängig ist.

Bei der Durchführung des Tests werden die Antigen - enthaltenden Proben - in unserem Fall Cl-INA haltiges Plasma - in definierter Menge in genormte Stanzlöcher auf einer Seite der Gelplatte eingebracht. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich die Anode des elektrischen Feldes. Der pH des Milieus ist dabei so beschaffen, daß die Antigenmoleküle sämtlich negativ geladen sind und somit das Gel von ihren Stanzlöchern in Richtung Anode durchwandern, während die Antikörper im Gegensatz dazu keine

definierte Wanderung zeigen, sondern diffus verteilt bleiben. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist dabei gegenüber der Wanderungsgeschwindigkeit, die von der Höhe des elektrischen Feldes abhängt, vernachlässigbar. Bei der Wanderung kommt es an den Seitenrändern der Antigensäule zu Präzipitationslinien. Der Antigenüberschuß in der Mitte der Säule wird so lange in Richtung Anode weiterwandern, bis es schließlich auch hier durch äquivalente Mengen an Antikörpern zur Präzipitation kommt. Die Höhe der Säule ist dabei abhängig von der Antigenkonzentration, der Antikörperkonzentration und der Laufzeit.

Nach Anfärben und Trocknen der Platten werden die Proben anhand mitaufgebrachter Referenzplasmen ausgewertet.

Abb. 3.2. zeigt die Abbildung einer Immunelektrophoreseplatte nach Laurell.

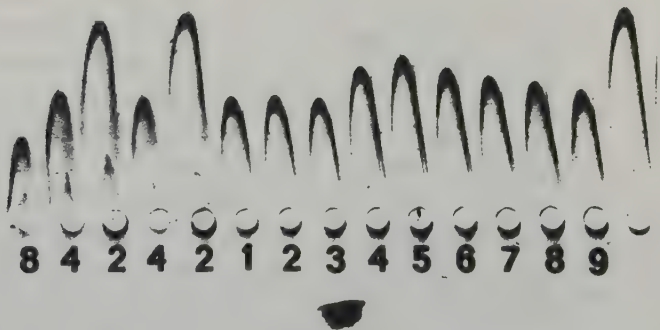


Abb. 3.2.

Darstellung einer Immunelektrophoreseplatte nach Laurell.

4. Prinzip und Durchführung chromogener Bestimmungen

4.1. Geschichte und allgemeine Grundlagen

Grundlage für die Entwicklung dieser Art von Testmethoden war der Wunsch, neben der Messung reiner Konzentrationen von Proteinen, wie es durch immunologische Methoden möglich war, etwas über ihre proteolytischen Aktivitäten aussagen zu können. Die natürlichen Proteinspaltprodukte der Proteasen quantitativ zu bestimmen, erwies sich technisch als äußerst schwierig. Man synthetisierte schließlich Moleküle, die in denjenigen Aminosäuresequenzen, die für die proteolytische Aktivität der Enzyme am biologischen Substrat verantwortlich zu sein schienen, mit natürlichen Substraten übereinstimmten und somit Spaltstellen imitierten. An dieser künstlichen Spaltstelle sollte nun die Proteolyse entsprechend der Enzymaktivitäten am biologischen Material ablaufen, nur mit dem Vorteil, daß die synthetischen Moleküle definierter herzustellen, zu reinigen und einzusetzen waren, und die Spaltprodukte besser meßbar sein sollten (siehe auch Abb. 4.1.1.).

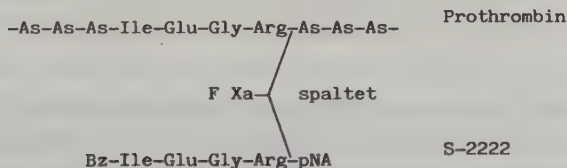


Abb. 4.1.1.:

Prinzip der Spaltung an einem synthetischen Molekül durch ein aktiviertes Enzym - hier F Xa - entsprechend der natürlichen

Spaltung am biologischen Substrat Prothrombin. Die Spaltung führt zur Freisetzung von gelbem Paranitroanilin (pNA), das photometrisch gemessen werden kann.

So stellten Neurath und Schwert (56,85) 1950 Aminosäureester als Substrat für Trypsin und Chymotrypsin vor. Analog dazu wurden in der Hämostaseologie Esterverbindungen von Arginin und Lysin für Thrombin und Plasmin verwendet (Sherry and Troll (12,77,89)). Es zeigte sich jedoch, daß die estero-lytische Aktivität von Proteasen nicht in direktem Verhältnis zu ihrer amidolytischen Aktivität steht. Auch die Bestimmung der Spaltprodukte, des Alkohols und der freien Aminosäuren war nicht ganz einfach.

Schließlich kam es 1961 zur Entwicklung eines Aminosäureamids, dem Bz-Arg-pNA·HCl (BAPNA). Die amidolytische Abspaltung der chromogenen Gruppe, dem Paranitroanilin, läuft hier parallel der proteolytischen Aktivität der entsprechenden Serin-proteasen und führt zur Freisetzung von gelbem p-Nitroanilin aus der ursprünglich farblosen Substanz (84).

(Siehe Abb. 4.1.1.)

Die anfangs sehr geringe Spezifität der ersten Substrate wurde inzwischen durch Entwicklung neuer Substrate verbessert.

Die Freisetzung von farbabsorbierenden Substanzen, wie dem pNA, ermöglichte es nun, diesen Reaktionsablauf zu verfolgen und quantitativ auszuwerten. Eine entscheidende Voraussetzung dazu zeigt Abb. 4.1.2.: Die Absorption des Farbprodukts muß in einem Wellenbereich liegen, in dem das intakte Substrat und das eventuelle Probenmaterial (z.B. Proteine) keine Eigenabsorption mehr aufweisen (84). Für das pNA liegt dieser Bereich bei 405 nm.

Daneben müssen die chromogenen Substrate noch eine Anzahl weiterer Anforderungen erfüllen, so z. B. die Spaltung nur an einer Stelle, hoher molarer Extinktionskoeffizient des Farbproduktes, eine Michaelis-Menten-Kinetik bei der enzymatischen Hydrolyse, hohe Wasserlöslichkeit, keine Hemmung des zu bestimmenden Enzyms durch Substratüberschuß und Linearität der Reaktion über einen großen Extinktionsbereich (84).

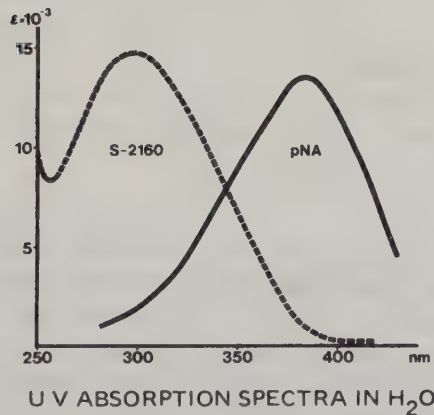


Abb. 4.1.2.:

Darstellung des UV-Absorptionsspektrums von S - 2160 als Substratbeispiel und para-Nitroanilin als Farbprodukt. Es wird deutlich, daß bei der Wellenlänge von 405 nm - hier werden die Messungen durchgeführt - das Substrat keine, das pNA eine hohe Eigenabsorption aufweist (nach 72).

4.2. Anwendung der chromogenen Bestimmung auf C1-INA

4.2.1. Bestimmung eines spezifischen Substrates

Entsprechend dem oben beschriebenen Prinzip der Aktivitätsbestimmung einer Protease, galt es nun, nach einem ausreichend spezifischen Substrat für die C1-INA Bestimmung zu suchen. Zusätzlich war es notwendig, eine definierte und gereinigte Menge des zu inaktivierenden Proteins, nämlich der C1-Esterase, herzustellen. Durch die Hemmung der proteolytischen Aktivität einer im Überschuß zugegebenen C1-Esterase, läßt sich schließlich die quantitative Konzentration des C1-Inaktivators im Testansatz bestimmen.

Von dem österreichischen Institut für Hämoderivate GmbH (Fa. Immuno) wird hierzu ein Konzentrat der C1-Esterase aus humanem Plasma hergestellt.

Die Abb. 4.2.1.1. zeigt die vergleichenden Untersuchungsergebnisse mit den verschiedenen Substraten. Während sich bei der Prüfung der proteolytischen Aktivität noch bei nahezu allen Substraten ein positives Ergebnis zeigte, konnte nach Ausschaltung der durch Thrombin induzierten Spaltung - die C1-Esterase Präparation enthält noch ca. 1,5 E/ml Thrombin - und nach Prüfung der Hemmbarkeit der C1-Esterase-Präparation durch Humanplasma, schließlich das Substrat S-2444 als das wohl geeignetste chromogene Substrat für die C1-INA Bestimmung herausgefiltert werden.

Amidolytische Reaktionen der verwendeten Cl-Esterase

Chromogene Substrate	Cl-Esterase	Thrombin (1,5 E/ml) + Hirudin	Cl-Esterase	Cl-Esterase + Plasma
S - 2160	0.22	0.21	0	Hemmung
S - 2222	0.14	0	0.13	Hemmung
S - 2238	0.63	0.79	0.12	Hemmung
S - 2266	0.104	0.2	0.90	Hemmung
S - 2302	0.5	0	0.3	keine Hemmung
S - 2251	0.35	0	0.31	leichte Hemm.
S - 2444	0.46	0	0.46	Hemmung
Chromozym TH 0.87		0.69	0.30	Hemmung
Chromozym PK 0		0	-	-

Abb. 4.2.1.1.:

Amidolytische Reaktionen der verwendeten Cl-Esterase mit den meisten derzeit erhältlichen, chromogenen Substraten (72).

Das Substrat S-2444 war bis dahin zur Urokinase-Bestimmung verwendet worden. Abb. 4.2.1.2. zeigt die Struktur des S-2444.

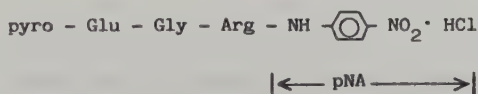


Abb. 4.2.1.2.:

Struktur des S-2444.

Das neue Testverfahren wurde mit dem klassischen Test nach Levy-Lepow (Esterasespaltung von ATEE) verglichen.

Wie Abb. 4.2.1.3. zeigt, ergab sich dabei ein Verhältnis von 1 : 6, d.h. 1 Plasmaeinheit entspricht ca. 6 Levy-Lepow-Einheiten. Die Plasmaeinheit, gemessen mit dem S-2444-Test, entspricht auch dem Test mit dem Substrat ATEE, wenn Normalplasma als Standard verwendet wird (72).

C1 - Esterase - Vergleichsbestimmungen

Präparation	S-2444-Test Plasma	ATEE-Teste -Einheiten	Levy-Lepow-Test Einheiten
1	71	76	451
2	12	12,7	75,6
3	10	12	ca. 60

1 Plasmaeinheit entspricht ca. 6 Levy-Lepow-Einheiten

Abb. 4.2.1.3.:

Vergleichsbestimmungen der verwendeten C1-Esterase-Präparationen mit den Testen nach Levy-Lepow, mit dem Substrat ATEE und S-2444 (72).

4.2.2. Materialien zur C1-Inaktivatorbestimmung

- C1-Esterase-Standard: Lot.-Nr. C 10179

zu lösen in 1 ml dest. H₂O; Lösung ergibt 1140 Esterase-Einheiten.

1 Esterase-Einheit verbraucht bei 37°C und einer Substrat-

konzentration von 0,05 M ATEE in 15 Minuten 0,05 mEq. NaOH.

Diese Bestimmung erfolgt analog der Methode nach Levy und Lepow.

- C1-Inaktivator-Standard: Lot.-Nr. C 110179
zu lösen in 1 ml dest. H_2O ; die Lösung enthält 75 Inaktivator-Einheiten.
1 C1-INA-Einheit neutralisiert 10 Esterase-Einheiten.
Der C1-INA-Standard ist bei der Bestimmung mittels einer Standardkurve von Normalplasmen nicht notwendig.
- Substrat S-2444; Fa. Kabi; zu lösen in 25 ml dest. H_2O
(1 mg/ml); die Lösung ist etwa 1 Stunde zu mischen.
- Tris-HCl-Puffer; 0,05 M, pH 8,3.
- Poolplasma: Plasmagemisch von mindestens 25 gesunden Personen, hergestellt von Normalpersonen der Blutbank des Bayerischen Blutspendedienstes, 8000 München 2, Beethovenplatz.

4.2.3. Geräte zur C1-Inaktivatorbestimmung

- 1 Wasserbad von 37°C;
- Eppendorf-Pipetten: 0,05 ml, 0,1 ml, 0,5 ml
- Einmal-Halbmikro-Küvetten; Einmal-Reagenzgläser;
- Vollautomatisches Spektralphotometer mit nachgeschaltetem programmierbarem Rechner (Hewlett-Packard)
- Kleingeräte: 2 Stoppuhren, Millimeterpapier;

4.2.4. Versuchsablauf zur C1-Inaktivatorbestimmung

Die Tatsache, daß es sich beim C1-Inaktivator um einen Inhibitor ohne eigene proteolytische Aktivität handelt, läßt eine direkte Bestimmung nach dem chromogenen Prinzip nicht zu. Es ist deshalb

notwendig, zuerst eine definierte Menge der Protease, die durch den Inaktivator neutralisiert wird, im Überschuß zuzugeben und den Komplex entstehen zu lassen. Schließlich kann man an der verbliebenen Restaktivität der Protease, über die chromogene Spaltung eines Substrates, die ursprüngliche Aktivität an C1-INA ermitteln (siehe Abb. 4.2.4.) .

C1-Inaktivator-Bestimmung

mit dem chromogenen Substrat S - 2444

1. C1-Esterase (Konzentrat) + Plasma $\longrightarrow$
 $\longrightarrow$ (C1-Esterase/Inaktivator-Komplex) + C1-Esterase
2. pyro-Glu-Gly-Arg-pNA $\xrightarrow{\text{C1-Esterase}}$ pyro-Glu-Gly-Arg + pNA

Abb. 4.2.4.:

Die Abbildung zeigt das Prinzip, nach dem die Bestimmung des C1-INA abläuft (genaue Beschreibung im Text).

Als Protease wird eine vorgereinigte C1-Esterase-Präparation der österreichischen Hämoderivate GmbH (Fa. Immuno, Wien) verwendet. Nach Inkubation dieser C1-Esterase mit dem Testplasma wird die noch bestehende C1-Esterase-Aktivität mit dem chromogenen Substrat S-2444 der Fa. Kabi gemessen.

Die quantitative Auswertung erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit Hilfe von Normalplasmen erstellt wird.

Als Ergebnis erhält man eine relative Aktivität (%), bezogen auf die Aktivität eines Normplasmapools, die per definitionem 100% beträgt.

Testansatz:

- 0,05 ml Cl-Esterase-Lösung
- 0,05 ml Plasmaprobe
- Inkubation: 5 Minuten bei 37°C
- 0,5 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer
- 0,1 ml Substrat-Lösung: 1 mg/ml (2 mM); S-2444
- Bestimmung der Extinktionsänderung/Minute bei 37°C und 405 nm.

In einem Wasserbad von 37°C werden 0,05 ml Esterase-Standard-Lösung und 0,05 ml unverdünntes Patientenplasma (Citratplasma) 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden der Reihenfolge nach 0,5 ml Tris-HCl-Puffer und 0,1 ml Substrat zugegeben und die Testlösung ohne Verzögerung in einer Kuvette (Halbmikro) in ein Spektralphotometer gebracht.

Die Messung der Extinktionsänderung erfolgt bei 405 nm und bei 37°C.

Zwischen den einzelnen Schritten ist mit einem Schüttler für eine optimale Vermischung der Substanzen zu sorgen. Exaktes Pipettieren ist besonders in Anbetracht der geringen Inkubationsmengen (0,05 ml) von entscheidender Bedeutung für eine korrekte Bestimmung.

Die Cl-Esterase-Standard-Lösung wurde in unserem Labor für jeden Bestimmungstag frisch hergestellt. Aus einem Gläschen Cl-Esterase-Standard-Lösung von 1 ml können etwa 19 Bestimmungen durchgeführt werden. Bei 50 Plasmabestimmungen pro Tag, das entspricht bei Doppelbestimmungen etwa 100 Testansätzen, wurden somit 6 Gläschen Cl-Esterase-Standard hergestellt und vermischt. Beim Auflösen der lyophilisierten Cl-Esterase ist darauf zu achten, daß - um Schaumbildung zu vermeiden - nicht geschüttelt werden darf. Die Lagerung der lyophilisierten Esterase erfolgt bei 4°C im Kühlschrank.

Die Herstellung der Substrat-Lösung erfolgte entsprechend. Der Inhalt eines Fläschchens (25 mg) wurde mit 25 ml dest. H_2O aufgelöst und anschließend etwa 1 Stunde mit einem Mischmagneten gemischt. Die Lagerung der Lösung, die für etwa 250 Bestimmungen ausreichte, erfolgte bei $4^{\circ}C$ in einer Dunkelflasche. Zur Vermeidung von Verunreinigung der Gesamtlösung wurde bei den einzelnen Bestimmungsserien eine entsprechende Menge in ein Reagenzglas abgefüllt und ein verbleibender Rest nicht mehr in das Aufbewahrungsgefäß zurückgefüllt. Die Haltbarkeit der Substrat-Lösung läßt sich wohl mit mehreren Monaten ansetzen. Eine eintretende Gelbfärbung weist auf den Verfall der Lösung hin.

Die bei $-40^{\circ}C$ tiefgefrorenen Patientenplasmen wurden erst kurz vor Testbeginn aufgetaut. Dies erfolgte bei $37^{\circ}C$ und 10 Minuten. Nach der Bestimmung wurden sie sofort wieder tiefgefroren.

Die Bestimmung erfolgte im ersten Ansatz aus unverdünntem Patientenplasma. Ergab sich bei dieser ersten Bestimmung ein Ergebnis, das größer als 100%, bezogen auf das Normplasma, war, so wurde das Plasma mit isotonischer Kochsalzlösung zu gleichen Teilen verdünnt und das Ergebnis entsprechend multipliziert. Auch zu hohe Grundextinktionen, etwa größer 0,700, wie sie z.B. beim Ikterus vorkommen können, lassen eine Verdünnung u. U. geraten erscheinen. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß der bei jeder Verdünnung eingehende Fehler möglicherweise größer ist, als der Fehler, der durch eine zu hohe Ausgangsextinktion verursacht werden kann. Stark lipämische und Gerinnsel enthaltende Plasmen können ebenfalls für Fehlbestimmungen verantwortlich sein.

Aufgrund der Ergebnisse der Qualitätskontrolle und der gewonnenen Erfahrungen erscheint es angebracht, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Auswertung:

Die sich ergebenden Extinktionsunterschiede, die in unserem Labor durch einen programmierbaren Rechner bereits ausgedruckt erscheinen, werden anhand einer Eichkurve, erstellt aus Normalplasma, in prozentuale Werte, bezogen auf ein Normalkollektiv, umgerechnet.

Der lineare Verlauf der Eichkurve (siehe 4.2.5.) ergibt einen Meßbereich von 0-100%.

Bei Ergebnissen, die über 100% liegen, muß die Probe mit isotonischer Kochsalzlösung vorverdünnt werden.

4.2.5. Erstellen einer Eichkurve

Zur Erstellung der Eichkurve wurde ein Plasmapool von Spenderplasma 25 gesunder Personen verwendet.

Der in mehreren Reagenzgläsern zu je 1 ml aufgeteilte Pool wurde bei -40°C tiefgefroren und nach dem Auftauen sofort verwendet.

Jede aufgetaute Plasmaprobe wurde nur einmal verwendet.

Mit diesem Plasma wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, die mindestens 5 Werte enthält und somit die entstehende Gerade ausreichend definiert.

Zur Verdünnung verwendet man isotonische Kochsalzlösung. Zu beachten ist, daß man die Verdünnungsmengen nicht zu klein wählt, um den Verdünnungsfehler möglichst gering zu halten. In unserem Labor wurden Mengen von 0,5 ml hergestellt.

Form:

Wie aus Abb. 4.2.5. ersichtlich, ergibt sich ein linearer Verlauf der Standardkurve zwischen 0% und 100%.

Werte:

- 100 % : unverdünntes Plasma
- 50 % : Plasma 1:2 verdünnt
- 25 % : Plasma 1:4 verdünnt
- 12,5 % : Plasma 1:8 verdünnt
- 6,2 % : Plasma 1:16 verdünnt
- 0 % : reine isotonische Kochsalzlösung

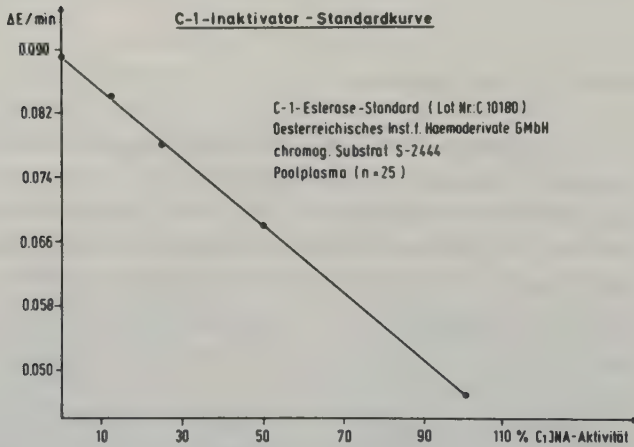


Abb. 4.2.5.:

C1-Inaktivator-Standardkurve, bestimmt mit dem C1-Esterase-Standard.

4.2.6. Zeit- und Arbeitsaufwand

Wie bereits erwähnt, stellt die chromogene Bestimmung des C1-Inaktivators eine elegante und schnelle Testmethode dar.

In unserem Labor beansprucht die Bestimmung von 4 Testplasmen etwa 10 Minuten. Damit können bei Doppelbestimmungen ca. 15 Patientenplasmen pro Stunde ausgewertet werden.

(In unserem Spektralphotometer ist die Bestimmung von 4 Proben gleichzeitig möglich).

Setzt man die Vorbereitungszeit, z.B. für Puffer und Verdünnungen, bzw. Eichkurvenerstellung und schließlich Auswertung der Ergebnisse mit etwa 1 Stunde an , so lassen sich während eines halben Arbeitstages (4 Stunden) ungefähr 50 Patientenplasmen bestimmen.

Geht man davon aus, daß in einem hämostaseologischen Labor täglich etwa 20 Plasmen eintreffen, bei denen eine Bestimmung des C1-Inaktivators von Vorteil wäre, so könnte man diesen Test, bei einem Aufwand von 2 halben Arbeitstagen pro Woche für eine MTA, in das Routineprogramm aufnehmen.

4.3. Methodische Ergebnisse und Normalwerte der C1-Inaktivator-Bestimmung

4.3.1. Normalwerte

Für die Festlegung von Normalwerten des C1-INA, sowohl nach der chromogenen, als auch nach der immunologischen Methode, bestimmten wir ein Normalkollektiv von 50 gesunden Personen im Alter von 20 - 40 Jahren.

Testbedingungen und Referenzplasmen wie oben beschrieben.

Ergebnisse im einzelnen:

Plasma-Nr.	chr. (%)	imm. (%)	P.-Nr.	chr. (%)	imm. (%)
1	85	75	26	94	92
2	106	88	27	95	136
3	94	98	28	91	72
4	91	100	29	91	88
5	98	97	30	106	90
6	85	108	31	99	80
7	100	118	32	114	92
8	100	104	33	98	76
9	95	96	34	120	94
10	100	112	35	87	104
11	91	102	36	110	100
12	82	92	37	122	122
13	85	96	38	89	84
14	91	98	39	87	128
15	94	100	40	122	146
16	110	100	41	82	86
17	100	94	42	88	106
18	91	94	43	94	122
19	116	104	44	100	84
20	94	96	45	97	102
21	116	146	46	100	117
22	88	94	47	97	138
23	99	90	48	88	126
24	88	74	49	100	100
25	92	94	50	112	118

Daraus ergibt sich für die:

Chromogene Bestimmung:

n = 50

- Mittelwert:	97,5 %
- Varianz:	106,8
- Standardabweichung:	10,4 %
- Variationskoeffizient:	10,7 %
- Normalbereich: (2s-Bereich)	77 - 119 %

Immunologische Bestimmung:

n = 50

- Mittelwert:	101,5 %
- Varianz:	304,5
- Standardabweichung:	17,6 %
- Variationskoeffizient:	17,3 %
- Normalbereich: (2s-Bereich)	67 - 137 %

4.3.2. Qualitätskontrolle:

Um die testbedingten Fehler und Abweichungen bei der C1-Inaktivator-Bestimmung zu quantifizieren, führten wir eine interserielle Qualitätskontrolle durch. Sie erstreckte sich über einen Zeitraum von 2 Monaten.

Testbedingungen:

- Das Plasma von 3 Testpersonen (A,B,C) wurde jeweils auf etwa 20 Plastikröhrchen zu je 0,5 ml verteilt und bei -40°C tiefgefroren.
- Zu jeder Bestimmungsserie der folgenden 2 Monate wurde je ein Plasma der Personen A, B, C mitbestimmt.
- Es ergaben sich 53 Bestimmungen
A = 18 Best., B = 18 Best., C = 17 Best.
- Es wurden für jedes Plasma Doppelbestimmungen durchgeführt.
- Plasma A und B lagen unter 100 % Aktivität, Plasma C etwas über bzw. um die 100 %, so daß bei der Serie C auch der Verdünnungsfehler quantifizierbar wurde.

Ergebnisse:

- Serie A:

- Mittelwert:	93,5 %
- Varianz:	15,25
- Standardabw.:	4 %
- Variationskoeff.:	4,3 %

- Serie B:

- Mittelwert:	87,9	%
- Varianz:	16,3	
- Standardabw.:	4,15	%
- Variationskoeff.:	4,72	%

- Serie C:

- Mittelwert:	100,9	%
- Varianz:	60,87	
- Standardabw.:	8	%
- Variationskoeff.:	7,96	%

Betrachtet man diese Ergebnisse, so zeigt sich, daß für die Serien A und B, d. h. für Werte die zwischen 0% und 100% liegen und deshalb nicht verdünnt werden müssen, die 2s-Schwankungsbreite bei

$$\underline{x = \pm 8\%} \quad (\text{ bzw. } 8,3 \% \text{ bei B })$$

liegt.

Serie C, dessen Mittelwert bei 101 % liegt und somit z. T. Verdünnungen erfordert, zeichnet sich durch eine wesentlich höhere Schwankungsbreite aus.

$$\underline{x = \pm 16\%}$$

Da sich jedoch Serie C im Bereich der Normalwerte bewegt, erscheint dieser Nachteil vertretbar.

Im entscheidenden Bereich, nämlich unter 100 %,erweist sich der Test mit einer Schwankungsbreite von $\pm 8 \%$ als hinreichend genau.

Ergebnis der Qualitätskontrolle:

Der Test ist, was seine systematische Fehlerbreite anbetrifft,
im klinischen Bereich anwendbar.

Ergebnisse der Qualitätskontrolle im einzelnen:

Serie	A %	B %	C %
1. Best: $\bar{x} =$	97	$\bar{x} =$ 92	$\bar{x} =$ 97
2.	91	83	100
3.	94	89	100
4.	97	86	108
5.	86	81	94
6.	91	83	95
7.	94	92	122
8.	89	92	100
9.	94	89	100
10.	89	86	94
11.	95	89	100
12.	97	92	100
13.	91	80	94
14.	100	91	118
15.	89	86	94
16.	92	92	100
17.	97	93	100
18.	100	87	-

Referenzplasma: " Labornormalpool "

4.3.3. Stabilität des C1-Inaktivators

Diese Frage erschien insofern interessant, da es während eines Routinealltags in einem hämostaseologischen Labor oft nicht möglich ist, Plasmen sofort zu bestimmen. Die Folge ist, daß Plasmen vor ihrer Verarbeitung oft stundenlang bei Zimmertemperatur lagern, bzw. tiefgefroren werden. Ob diese Tatsache Einfluß auf die Aktivität des C1-INA nimmt, sollten folgende Versuche klären.

- 2 Plasmen wurden bei -40° C tiefgefroren und über einen Zeitraum von 3 Monaten insgesamt 10-mal aufgetaut und die C1-INA-Bestimmung durchgeführt.

Es sollte sich zeigen, ob mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren bzw. längere tiefgefrorene Lagerung, die C1-INA-Aktivität der Probe verändern.

Ergebnisse:

	Plasma 1 (%)	Plasma 2 (%)
3.6.80 (Ausgangswert)	$\bar{x} = 34$	$\bar{x} = 76$
22.7.80	42	83
23.7.80	33	75
24.7.80	38	78
25.7.80	32	77
5.9.80	42	74
8.9.80	47	81
9.9.80	40	77
10.9.80 (1)	46	83
10.9.80 (2)	38	82
15.9.80	39	68

Es fand sich auch nach 10-maligem Auftauen und Wiedereinfrieren keine signifikante Änderung der Cl-INA-Aktivität.

- 2 Plasmen wurden bei 4° C im Kühlschrank bzw. bei 20° C Zimmertemperatur gelagert (jeweils 1 Plasma).
- Es sollte geklärt werden, ob längere Lagerung bei diesen Temperaturen ohne Tiefgefrieren eine Änderung der Cl-INA-Aktivität verursacht. Es handelt sich um ein Normalplasma.

Ergebnisse:

	Plasma 1 (%) (4° C)	Plasma 2 (%) (20° C)
Ausgangswert: $\bar{x}$ =	98	102
4 h :	101	96
24 h :	97	100
48 h :	98	95
72 h :	94	-
1 Woche :	85	-

Als Ergebnis zeigt sich, daß in dem in der Praxis wichtigen Zeitraum von 24 Stunden es zu keiner signifikanten Abnahme der Cl-Inaktivator-Aktivität kommt.

Erst ab einer Zeitdauer von einer Woche Lagerung bei 4° C ist eine deutliche Abnahme der Aktivität festzustellen.

Als Quintessenz dieser Untersuchung läßt sich feststellen, daß eine Anwendung des Testes im Routinealltag, mit den oben angeführten Problemen der verzögerten Bestimmung, ohne weiteres durchführbar ist.

Die Ergebnisse entsprechen weitgehend denjenigen, die Levy und Lepow angeben (50). Sie fanden eine Stabilität des Inhibitors von wenigstens 24 h bei 0° C, 21° C und 37° C; von wenigstens 4 Monaten bei -45° C und keine Veränderung durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen.

5. Vergleich der chromogenen Bestimmung mit der immunologischen Technik nach Laurell

5.1. Vergleich der Standardkurven und der Normalbereiche

Wie bereits in Kapitel 1 hingewiesen, wurde in bisherigen Untersuchungen der Beziehung zwischen der Aktivitäts- und der Konzentrationsbestimmung des C1-Inaktivators wenig Beachtung geschenkt. Als Astrup et alii in einer Studie über C1-INA-Spiegel bei Patienten mit Malignomen (8) zu anderen Ergebnissen kam als vor ihm Lachman et alii (46), wies er kurz darauf hin, daß es sich bei seinen Untersuchungen um C1-INA-Konzentrationen handle, während Lachman Aktivitäten bestimmt hatte.

In welcher Beziehung stehen nun aber Konzentration und Aktivität des C1-INA zueinander?

Um diesem Problem näher zu kommen, erstellten wir zunächst einmal die Standardkurven eines Normalplasmas mit beiden Methoden.

- mit der chromogenen Aktivitätsbestimmung
- der immunologischen Technik nach Laurell

In der Abbildung 5.1. ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß unter Normalbedingungen eine hochsignifikante Korrelation zwischen beiden Bestimmungsmethoden besteht. Die Tatsache, daß die immunologische Konzentration niedriger liegt, als die Aktivität - es sollte eigentlich umgekehrt sein - soll hier nicht weiter stören. Es handelt sich hier um ein Normalplasma, bei dem beide Werte sehr eng beieinander liegen, so daß beim Erstellen der Referenzkurven geringe Schwankungen diesen Effekt hervorrufen können.

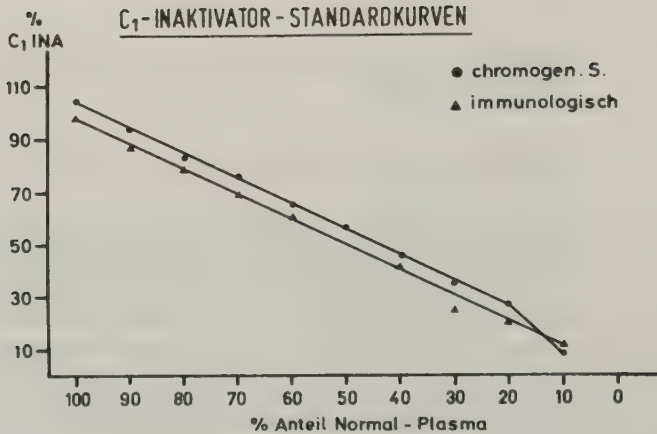


Abb. 5.1.:

Darstellung der Korrelation der C1-Inaktivator-Standardkurven, gemessen mit dem chromogenen Substrat S-2444 und der immunologischen Technik nach Laurell.

5.2. Differenzen bei Normalpersonen

Als nächstes verglichen wir die C1-INA-Bestimmungen mit beiden Methoden bei 50 Normalpersonen. Die Ergebnisse im einzelnen wurden bereits unter 4.3. aufgeführt.

Die Abb. 5.2. zeigt das Ergebnis noch einmal in graphischer Form anhand zweier Stabdiagramme. Es fällt auf, daß die immunologischen Werte eine größere Streubreite besitzen. Laut Berechnung (siehe 4.3.1.) zeigt sich ein Normalbereich von

77 - 119 % für die Aktivitätsbestimmung

67 - 137 % für die Konzentrationsbestimmung

Die Aussagefähigkeit, was Abweichungen vom "Normalen" betrifft, scheint somit für die Aktivitätsbestimmung größer zu sein.

Stabdiagramm für C1-Inaktivator-bestimmungen bei 50 Normalpersonen

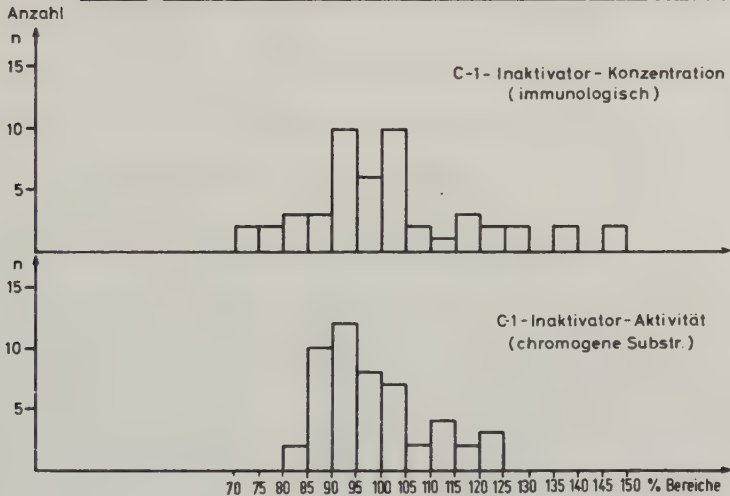


Abb. 5.2.:

Stabdiagrammdarstellung der Normalverteilung für die C1-Inaktivator-Konzentration, bzw. - Aktivität bei 50 Normalpersonen.

Es schien nun interessant, diese Differenzen zwischen den beiden Bestimmungen zahlenmäßig auszudrücken, ihre Spannweiten bei den Normalpersonen zu berechnen und somit die noch als normal geltende, maximale Differenz zumindest größenordnungsmäßig anzugeben.

Ergebnisse: $n = 50$

- Mittelwert d. Differenzen : 13,6 %
- Varianz: 121,88
- Standardabweichung: 11,2 %

- Variationskoeff.: 82,12 %
- Normalbereich (2s-Bereich) bis 36 %

Ergebnisse im einzelnen: (siehe auch 4.3.1.)

Plasma-Nr.	Diff.%	P.-Nr.	Diff.%	P.-Nr.	Diff.%
1	10	18	3	35	17
2	18	19	12	36	10
3	4	20	2	37	0
4	9	21	30	38	5
5	1	22	6	39	41
6	23	23	9	40	24
7	18	24	14	41	4
8	4	25	2	42	18
9	1	26	2	43	28
10	12	27	41	44	16
11	11	28	19	45	5
12	10	29	3	46	17
13	11	30	16	47	41
14	7	31	19	48	38
15	6	32	22	49	0
16	10	33	22	50	6
17	6	34	26		

Es zeigt sich, daß bei offensichtlich gesunden Personen Differenzen bis zu etwa 40 % auftreten können.

5.3. Differenz bei Intensivpatienten

Ausgehend von dieser Tatsache, stellten wir eine Plasmaserie von 38 Intensivpatienten zusammen, um zu sehen, ob bei diesen pathologischen Plasmen die Spannweite von 40 % überschritten wird.

Die 38 Plasmen entstammten einem Pool, der bereits nach der chromogenen Methode bestimmt worden war. Es sollte dabei ein möglichst großer Aktivitätsbereich dargestellt werden.

Wir unterteilten 8 Bereiche:

<20%; 20 - 40%; 40 - 60%; 60 - 80%; 80 - 100%; 100 - 120%;
120 - 140 %; >140%;

Jede dieser Gruppen enthält 3 - 5 Plasmen. Ansonsten war die Auswahl zufällig, ohne Beachtung der Krankheitsbilder.

Ergebnisse im einzelnen:

Bereich:	Patient:	C1-INA-Akt.:	C1-INA-Konz.:	Diff.:
20 %	A.G.	15 %	88 %	73 %
	J.E.	9 %	62 %	53 %
	W.I.	13 %	88 %	75 %
	T.T.	10 %	78 %	68 %
	D.U.	6 %	63 %	57 %
20 - 40 %	A.G.	25 %	64 %	39 %
	W.E.	29 %	96 %	67 %
	E.T.	30 %	82 %	52 %
	G.J.	31 %	36 %	5 %
	R.B.	39 %	66 %	27 %
40 - 60 %	R.A.	46 %	64 %	18 %
	O.R.	47 %	90 %	43 %
	B.E.	51 %	62 %	11 %
	D.	58 %	70 %	12 %
	F.J.	58 %	174 %	116 %
60 - 80 %	A.J.	62 %	62 %	0 %
	S.A.	62 %	100 %	38 %
	D.R.	68 %	98 %	30 %

Bereich:	Patient:	C1-INA-Akt.:	C1-INA-Konz.:	Diff.:
60 - 80 %	F.G.	70 %	88 %	18 %
	D.K.	72 %	78 %	6 %
	D.E.	77 %	94 %	17 %
80 - 100 %	D.U.	81 %	74 %	7 %
	D.H.	91 %	80 %	11 %
	T.L.	96 %	98 %	2 %
100 - 120 %	H.	102 %	160 %	58 %
	G.G.	103 %	120 %	17 %
	K.R.	112 %	200 %	88 %
	K.R.	114 %	108 %	6 %
	Z.R.	116 %	170 %	54 %
120 - 140 %	B.M.	122 %	180 %	58 %
	S.L.	126 %	170 %	44 %
	S.J.	132 %	140 %	8 %
	R.I.	135 %	184 %	49 %
	S.A.	135 %	170 %	35 %
140 %	B.H.	153 %	176 %	23 %
	K.R.	146 %	200 %	54 %
	G.R.	162 %	230 %	68 %
	G.G.	175 %	235 %	60 %
	D.U.	195 %	240 %	45 %

Die Ergebnisse zeigen, daß bei den pathologischen Plasmen etwa die Hälfte der 39 Patienten die Normaldifferenz von ca. 40 % zum Teil sehr deutlich überschreiten.

Besonders in den Bereichen <40% und >120% ist der Anteil der erhöhten Differenzen vermehrt.

Es zeigt sich, daß bei den pathologischen Plasmen bereits der Mittelwert der Differenzen bei etwa 38 % liegt.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 5.3. noch einmal graphisch dargestellt. Dabei sind die Differenzen der Patienten und der Normalpersonen in einem Diagramm zusammengefaßt.

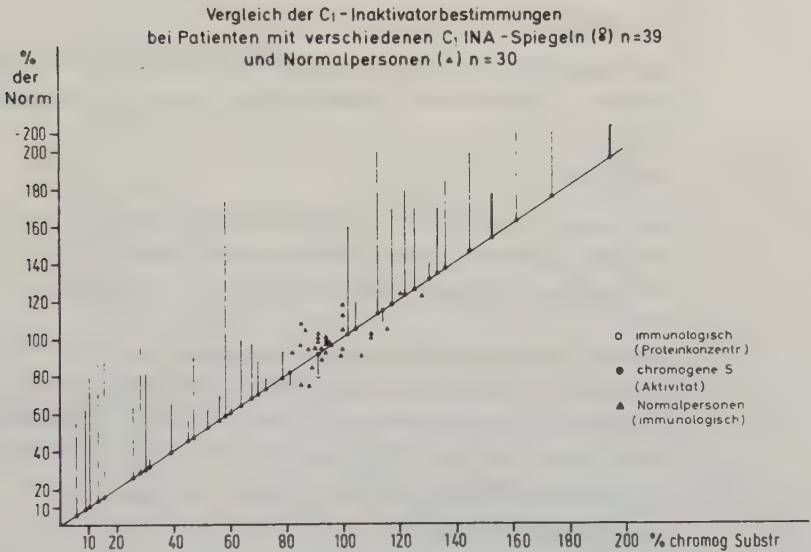


Abb. 5.3:

Darstellung der Unterschiede zwischen Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmung des C₁-Inaktivators bei Normalpersonen und Patienten einer Intensivstation.

6. C1-INA bei verschiedenen thrombophilen Diathesen und
allgemeinen schweren Erkrankungen

In diesem Abschnitt der Untersuchungen sollte versucht werden, erste Erfahrungen mit dem neuen chromogenen Test an einem klinischen Patientengut zu sammeln und die Bedeutung von aktivem und inaktivem C1-INA bei pathologischen Plasmaproben darzustellen.

Patientengut:

Die Plasmaproben entstammen nahezu ausschließlich einem Patientenkollektiv einer internen Intensivstation einer großen Universitätsklinik.

Methodik:

Die Proben wurden dem anfallenden Untersuchungsmaterial eines hämostaseologischen Labors entnommen. Dabei handelt es sich um Citratplasma, das bis zur Bestimmung bei -40° C tiefgefroren wurde.

Bestimmt wurden neben dem Routine-Gerinnungsprogramm (Thromboplastinzeit, Thrombinzeit, Thrombozyten, Fibrinogen, PTT und Godaltest) die Antithrombin-III-Aktivität und der C1-Inaktivator, sowohl nach der chromogenen Methode, als auch nach der Immuntechnik nach Laurell.

Bewertung und Darstellung:

Nach Studium der Krankengeschichten wurden die Patienten zu verschiedenen Krankheitsgruppen zusammengestellt, wobei versucht werden sollte, die Zusammenhänge zwischen den sich ergebenden Krankheitsbildern und den dabei auftretenden C1-INA-Aktivitäten, bzw. der Gerinnungssituation, darzustellen.

Einzelne Patienten, deren Krankheitsverlauf sehr instruktiv erschien, bzw. die sich nicht einer Krankheitsgruppe zuordnen ließen, wurden in Einzelkasuistiken dargestellt.

6.1. C1-Inaktivator bei Lebererkrankungen und gastrointestinalen Blutungen

6.1.1. Leberzirrhose ohne Blutung

Diese Gruppe umfaßt 4 Patienten, wobei bei 2 Patienten (R.A., K.A.) die Leberzirrhose als gesichert gilt, bei 2 Patienten (V.I., S.C.) zumindest eine schwere Hepatopathie angenommen werden muß. Transaminasen und gamma-GT waren bei allen 4 Personen mittelgradig erhöht.

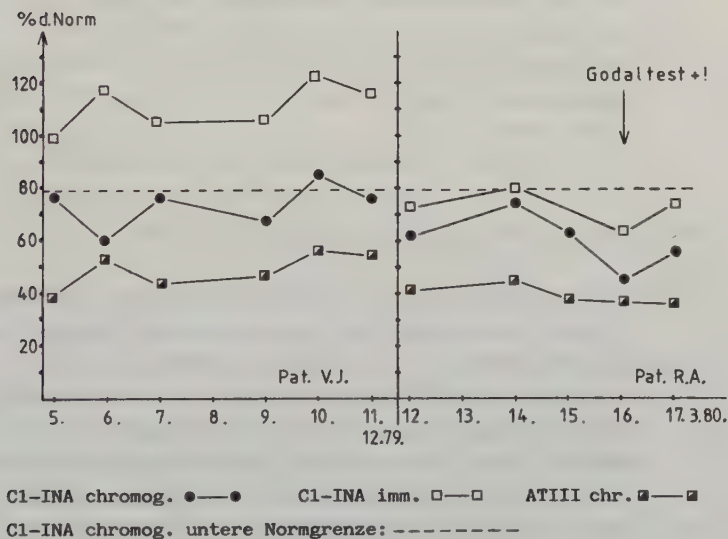


Abb. 6.1.1.:

Darstellung des C1-INa und ATIII-Verlaufs bei 2 Patienten mit Leberzirrhose ohne Blutung.

2 Patienten (V.I., R.A.) zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraums deutlich erniedrigte C1-INA-Aktivitäten, während die C1-INA-Konzentrationen noch im Normbereich lagen (siehe Abb. 6.1.1.). Die Differenzen zwischen beiden Werten waren nicht erhöht. Die Gerinnungsfaktoren waren ebenfalls z.T. erheblich vermindert (Quick, Thrombozyten, PTT verlängert), der Godaltest in einem Fall positiv (siehe Abb. 6.1.1.).

Bei den anderen 2 Patienten (K.A., S.C.) waren die C1-INA-Aktivitäten während des gesamten Beobachtungszeitraums normal, die Konzentrationen jedoch erhöht, so daß durchwegs Differenzen von durchschnittlich 60 % auftraten. Die Gerinnungswerte waren bis auf erniedrigte Thrombozyten in beiden Fällen (unter 100 000) im Normbereich. Der Godaltest war durchwegs negativ.

6.1.2. Leberzirrhose mit gastrointestinaler Blutung

Diese Gruppe umfaßt 13 Patienten, bei denen die Leberzirrhose klinisch gesichert und die Ösophagusvarizenblutung endoskopisch nachgewiesen war.

Bei allen Patienten zeigte sich ein C1-INA-Aktivitätsspiegel z.T. weit unter dem Normalbereich, während die Konzentrationen wieder überwiegend - bis auf 3 Fälle - keine pathologischen Werte zeigten (siehe Ergebnistabelle). Alle Patienten hatten während des Klinikaufenthaltes mehrfach geblutet und waren z.T. umfangreich substituiert worden. (Vollblut, FFP, PPSB, ATIII). Die Differenzen zwischen Aktivität und Konzentration waren bei 8 Patienten normal, bei 5 Patienten z.T. erheblich erhöht.

Abb. 6.1.2. zeigt diese Gruppe mit ihren Durchschnittswerten in einem Diagramm.

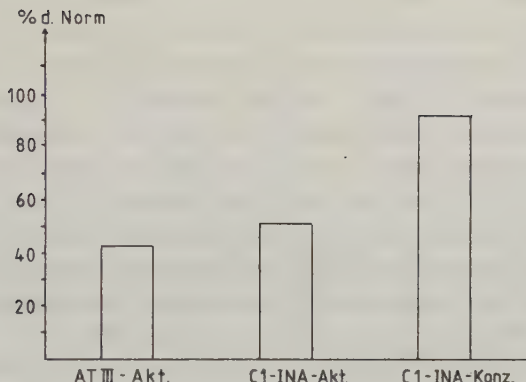


Abb. 6.1.2.:

Durchschnittswerte der 13 Patienten mit Leberzirrhose und gastrointestinaler Blutung an C1-INA und ATIII

6.1.3. Gastrointestinale Blutung ohne Leberzirrhose

Diese Gruppe umfaßt 19 Patienten. Sie dient hauptsächlich als Kontrollgruppe zur Vorhergehenden, um den Einfluß der Leberfunktionsfähigkeit auf die C1-INA-Spiegel zu klären. Als Blutungsursachen sind hier zu nennen: Ulcera des Magen-Darm-Traktes in 13 Fällen; Mallory-Weiß-Blutung in 2 Fällen; Varizenblutung bei Pfortaderthrombose in einem Fall; ungeklärte Blutungsquelle in 2 Fällen; schließlich 1 Dieulafoy-Blutung. Bei 14 Patienten waren die chromogenen Werte im Normalbereich, wobei bei 8 von diesen 14 die Differenzen zwischen chromog. und immunologischen Werten im Normalbereich lagen, während sie bei den restlichen 6 Patienten geringgradig bis mäßig erhöht waren (44 - 66 %). Die C1-INA-Konzentrationen lagen bei diesen 14 Personen etwa zur Hälfte über der Norm. (siehe auch Ergebnistabelle).

Bei 5 Patienten dieser Gruppe zeigten sich erniedrigte Cl-INA-Aktivitäten bei normaler ($n = 3$), bzw. erhöhter Differenz ($n = 2$) zu den Proteinkonzentrationen. Die immunologischen Werte lagen bei allen Patienten im Normalbereich (siehe auch Ergebnistabelle). Bei 4 Patienten handelte es sich lediglich um geringfügige Erniedrigungen unter den Normbereich, wobei auch die Quickwerte etwas unter der Norm lagen, in einem Fall unter 60 % (E.M.). Dabei war es zu einer stärkeren Blutung gekommen mit Hb-Abfall auf 7 mg% und schwach positivem Godaltest. Hier ist das Problem von Mikrozirkulationsstörungen mit Auswirkung auf das Hämostasesystem, bzw. eines stärkeren Verdünnungseffektes, durch umfangreiche Substitution zu diskutieren.

Ansonsten war der Verlauf bei diesen 4 Personen ohne Komplikationen.

Der starke Cl-INA-Aktivitätsabfall von 96 % auf 30 % bei einem Patienten konnte bei sonst normaler Gerinnung und unkompliziertem Verlauf nicht geklärt werden. Auch die Differenz zur Konzentration war bei diesem Patienten erhöht. Als Erklärungsversuche wären das Absetzen der Substitutionstherapie 2 Tage zuvor, bzw. das Auftreten von Temperaturen ($39,5^{\circ}\text{C}$) bei einer Phlebitis einen Tag vorher, zu nennen.

Bei der 2. Patientin mit erhöhter Differenz, bei erniedrigten chromog. Werten, ergab die Sektion eine ausgeprägte Fettleber, so daß hier Störungen von Seiten der Leber möglich sind.

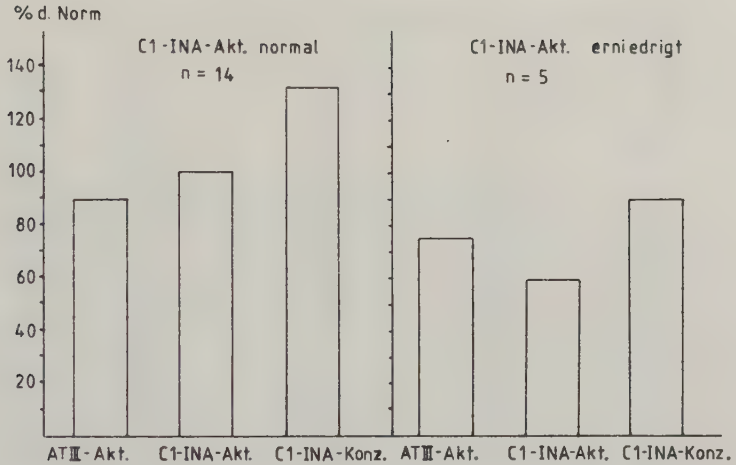


Abb. 6.1.3.1.:

Durchschnittswerte von 19 Patienten mit GI - Blutung, aufgeteilt in normale und erniedrigte Aktivitätsspiegel an C1-INA.

Dargestellt sind die Aktivität und Konzentration an C1-INA und die Aktivität an ATIII.

Ergebnisse der Patienten unter 6.1. im einzelnen:

Patient	C1-INA-Akt.:	C1-INA-Konz.:	Differ.:	ATIII
A: Patienten mit Leberzirrhose ohne Blutung (6.1.1.)				
S.C.	78 %	136 %	58 %	64 %
K.A.	69 %	120 %	51 %	38 %
V.I.	60 %	116 %	56 %	51 %
R.A.	46 %	64 %	18 %	39 %

Patient	C1-INA-Akt.:	C1-INA-Konz.:	Differ.:	ATIIII
---------	--------------	---------------	----------	--------

B: Patienten mit Leberzirrhose und Blutung (Gr. 6.1.2.)

A.L.	57 %	92 %	35 %	-
D.	58 %	70 %	12 %	46 %
F.J.	39 %	74 %	35 %	46 %
F.G.	67 %	92 %	25 %	39 %
G.J.	31 %	36 %	5 %	36 %
O.H.	66 %	82 %	16 %	63 %
P.E.	53 %	62 %	9 %	44 %
H.R.	67 %	88 %	21 %	45 %
L.T.	38 %	138 %	100 %	30 %
M.S.	22 %	71 %	49 %	36 %
P.M.	41 %	94 %	53 %	41 %
P.H.	68 %	114 %	46 %	60 %
R.B.	61 %	178 %	117 %	35 %

C: Patienten mit GI-Blutung ohne Leberzirrhose (Gr. 6.1.3.)

D.H.	82 %	100 %	18 %	90 %
F.T.	120 %	154 %	34 %	111 %
P.A.	81 %	80 %	1 %	85 %
R.S.	86 %	86 %	0 %	100 %
S.F.	117 %	118 %	1 %	-
T.N.	132 %	162 %	30 %	85 %
W.E.	81 %	100 %	19 %	80 %
B.M.	100 %	136 %	36 %	80 %
H.W.	110 %	176 %	66 %	94 %
K.	80 %	136 %	56 %	85 %
S.L.	100 %	156 %	56 %	98 %
B.E.	100 %	160 %	60 %	110 %
V.H.	100 %	144 %	44 %	73 %
P.C.	113 %	158 %	45 %	85 %

Patient	C1-INA-Akt.:	C1-INA-Konz.:	Differ.:	ATIII
E.M.	64 %	66 %	2 %	88 %
S.G.	65 %	88 %	23 %	73 %
Z.J.	73 %	76 %	3 %	68 %
S.E.	64 %	130 %	66 %	73 %
W.E.	30 %	96 %	66 %	-

Bildet man die Mittelwerte der einzelnen Gruppen A, B und C, so ergibt sich für

A:	C1-INA-Akt. _m =	63 %
	C1-INA-Konz. _m =	110 %
	ATIII-Akt. _m =	48 %
B:	C1-INA-Akt. _m =	51 %
	C1-INA-Konz. _m =	92 %
	ATIII-Akt. _m =	43 %
C:	C1-INA-Akt. _m =	89 %
	C1-INA-Konz. _m =	122 %
	ATIII-Akt. _m =	87 %

Aus der Abb. 6.1.3.2. wird der Einfluß der Leberzirrhose auf den Plasmaaktivitätsspiegel an C1-INA und ATIII deutlich.

So liegen im Normbereich nur Patienten ohne Leberzirrhose, während im pathologischen Bereich, v.a. bei den stark erniedrigten Aktivitäten ($\leq 60\%$), die Patienten mit Leberzirrhose deutlich überwiegen.

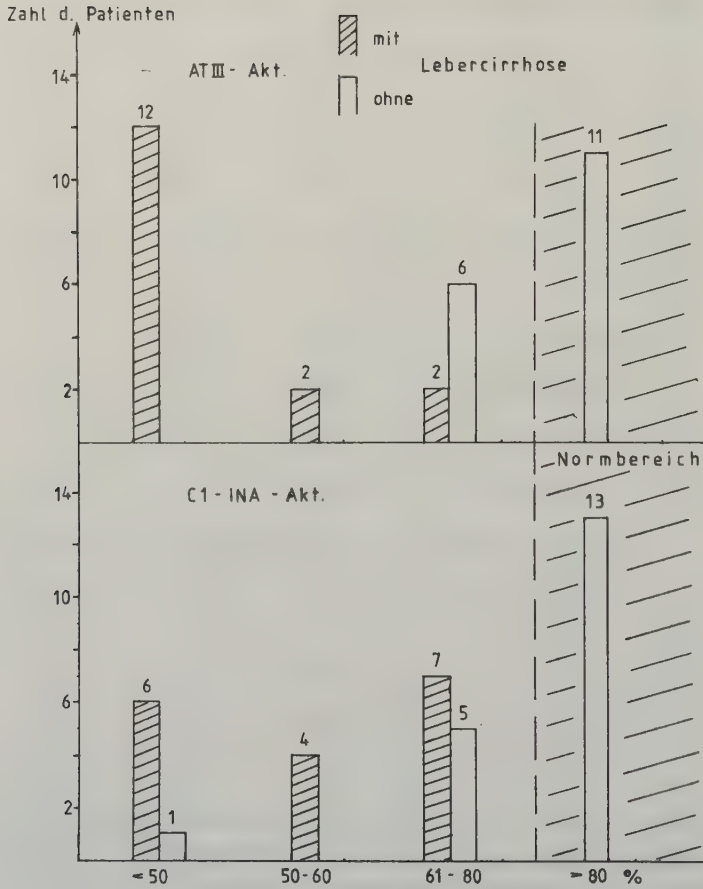


Abb. 6.1.3.2.:

Darstellung der unter 6.1. aufgeführten Patienten nach verschiedenen Aktivitätsbereichen an ATIII und C1-INA, bzw. aufgeteilt in Patienten mit Leberzirrhose und ohne Leberzirrhose.

Eine statistische Berechnung in der Patientengruppe unter 6.1. ergibt eine signifikante Korrelation zwischen ATIII-Aktivität und C1-INA-Aktivität mit

$$r = 0,82; \quad p < 0,001; \quad n = 33 \quad (\text{siehe Abb. 6.1.3.3.})$$

und zwischen C1-INA-Aktivität und C1-INA-Konzentration mit

$$r = 0,66; \quad p < 0,001; \quad n = 36.$$

Letzteres wohl als Ausdruck der C1-INA-Synthese in der Leber, bzw. deren Verminderung.

Die Korrelation zwischen ATIII-Aktivität und C1-INA-Aktivität kann Ausdruck sein, sowohl für eine Beeinflussung der Synthese beider Faktoren in dieser Gruppe, als auch für einen gemeinsamen Verbrauch aufgrund einer vorliegenden DIC.

Abb. 6.1.3.3. zeigt diese Korrelation zwischen ATIII und C1-INA graphisch.

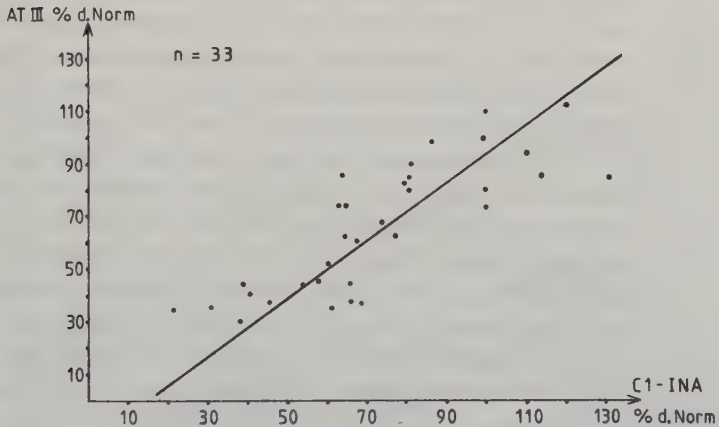


Abb. 6.1.3.3.

Darstellung der Korrelation zwischen ATIII-Aktivität und C1-INA-Aktivität als Regressionsgerade bei der Patientengruppe unter 6.1.

6.1.4. Kasuistik von 3 Patienten mit Lebererkrankung

Patient 1 : M.S. männlich, 67 Jahre

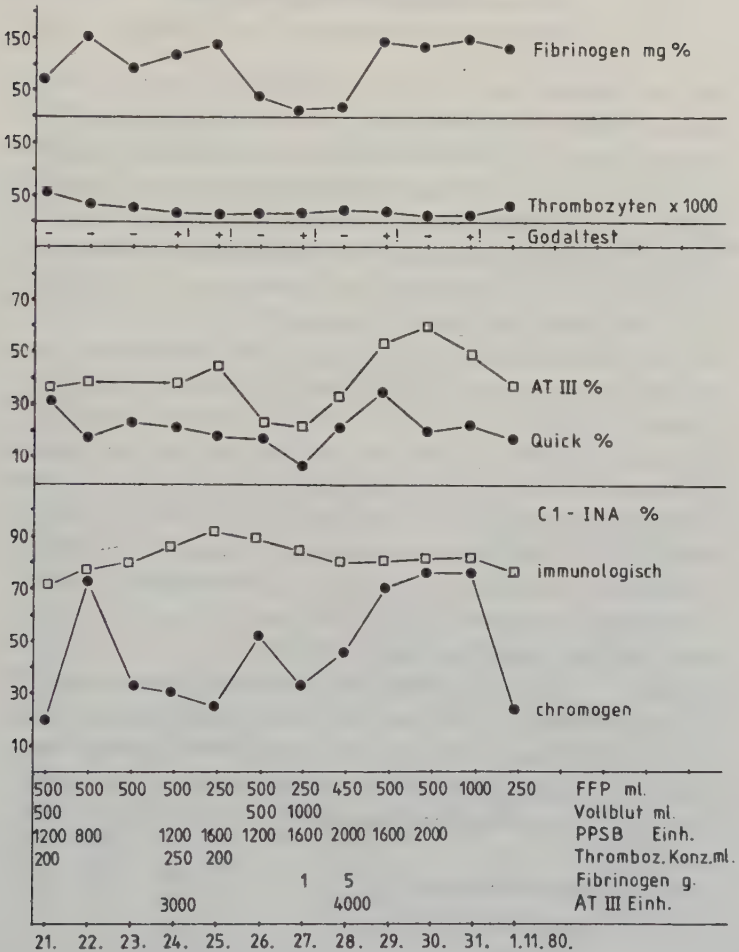
Diagnose: 1. Ösophagusvarizenblutung bei akuter Leberzirrhose
(Hepatitis B und E-Antigenpersistenz) mit
portaler Hypertension
2. Z.n. Thrombektomie aus der Arteria poplitea li.
Oktober 1980

Auf unserer Intensivstation zeigte der Patient das Bild eines schweren Kreislaufschocks mit RR syst. von 80 mmHg, Temperaturen um 39° C und er entwickelte eine Aspirationspneumonie bds. Der Verlauf war durch eine schwere Gerinnungsstörung gekennzeichnet. Sämtliche Gerinnungsfaktoren zeigten stark pathologische Werte. Der Godaltest war z.T. positiv. Auch umfangreiche Substitution konnte diesen Abfall nicht verhindern. Schließlich kam es sogar zu einem Defibrinierungssyndrom. Parallel dieser Entwicklung gingen die Aktivitätsspiegel des C1-Inaktivators. Auch sie waren zu Beginn erniedrigt, stiegen im Verlauf der Behandlung, als man die Gerinnungssituation etwas in den Griff bekam, bis an die untere Normgrenze an, um dann am Todestag des Patienten noch einmal stark abzufallen. Dagegen lag die immunologisch festgestellte Konzentration des C1-INA während des gesamten Zeitraums im Normalbereich. Ob dieser Verbrauch des C1-INA allein als Inhibitor der Gerinnung vonstatten ging, oder ob ein fragliches septisches Geschehen kausal beteiligt war (jedoch keine positive Blutkultur, Temperatur nie über 39° C), ist zu diskutieren. Der Patient verstarb schließlich am 1.11.80. Verlauf der Gerinnungsparameter siehe Abbildung 6.1.4.1.

Abb. 6.1.4.1.:

Patient M.S., männlich, 67 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



Patient 2: A.G., weiblich, 32 Jahre

Diagnose: 1. Schwangerschaftsfettleber; Z.n. Sectio am 5.12.79;
2. dialysepflichtige Niereninsuffizienz;
3. hämorrhagische Diathese mit rez. Blutungen

Bei der Patientin war während der Gravidität ein hohes Kreatinin von 1,9 und eine Thrombozytopenie von 81 000 aufgefallen. Verschlechterung des Allgemeinbefindens und Zunahme des Kreatinins führten zur Sektio am 5.12.79. Aufgrund von Blutungen postoperativ und einem Abfall des Fibrinogens auf 65 mg% wurde die Pat. auf unsere Intensivstation verlegt. Ein vermutetes septisches Geschehen bei Ileus, Leukozytose und Thrombozytopenie konnte durch eine Probelaaparotomie nicht bestätigt werden.

Es zeigten sich bei der Pat. weiterhin Funktionsstörungen innerer Organe, wie Niereninsuffizienz, Lungenfunktionsstörungen und Schäden der Leber in Form einer Schwangerschaftsfettleber, wobei ein LDH-Anstieg auf 1752 mit LDH 5 von 22% für eine schwere Schädigung sprach. Für die hämorrhagische Diathese ist einerseits eine DIC, andererseits eine gesteigerte Fibrinolyse, angezeigt durch eine erhöhte Thrombinkoagulasezeit, anzusehen. Auch durch Hemmung der Fibrinolyse mit Trasylol und Substitution der Gerinnungsfaktoren (PPSB) und der Thrombozyten konnten Blutungskomplikationen nicht verhindert werden.

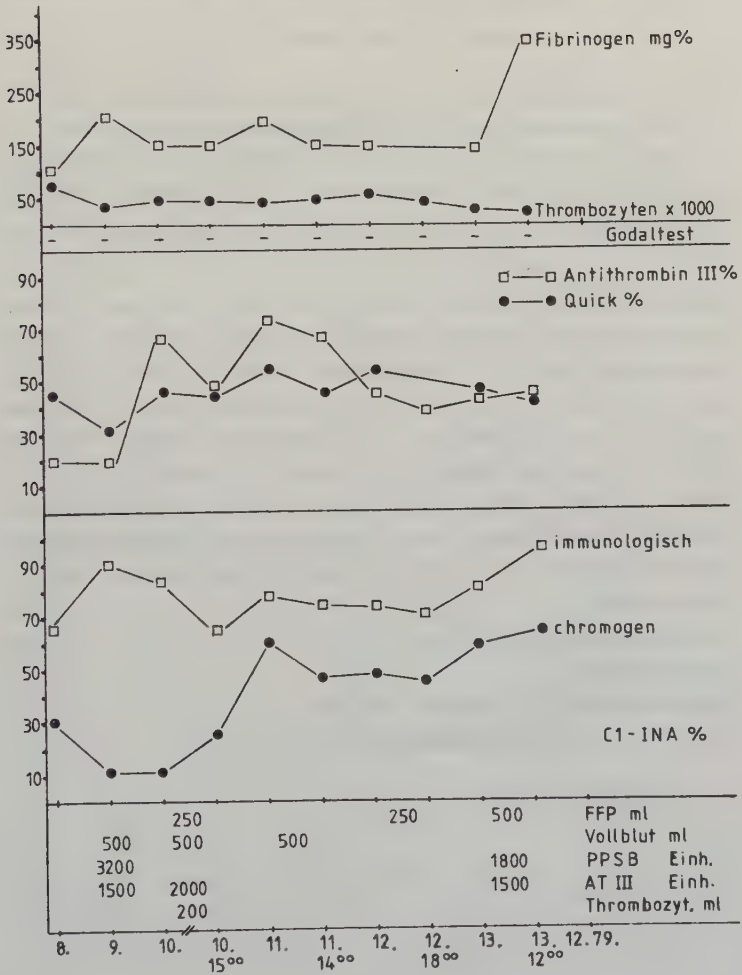
Wie Abb. 6.1.4.2. zeigt, waren die Gerinnungsparameter überwiegend pathologisch, der Godaltest jedoch immer negativ. Auch die Aktivität des C1-INa weist hier wieder stark pathologische Werte auf, die Konzentrationen waren überwiegend (bis auf 2 Werte) noch im Normbereich; das ATIII vor Substitution deutlich erniedrigt.

Die Pat. verstarb am 13.12.79.

Abb. 6.1.4.2.:

Patient A.G. weiblich, 32 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



Patient 3: O.R., männlich, 51 Jahre

Diagnose: 1. Jejunocolische Fistel

2. kleinknotige Leberzirrhose

3. Z.n. Sepsis unklarer Genese

Der Patient war zur Revision einer gastrocolischen Fistel in die Klinik eingewiesen worden, wurde jedoch aufgrund zunehmender cerebraler Eintrübung am 24.10. auf unsere Intensivstation übernommen. Das klinische Bild sprach für einen septischen Schock. Eine Probelaaparotomie am 25.10. konnte keinen Sepsisherd aufdecken.

Unter einer entsprechenden Therapie mit Antibiotika erholte sich der Patient sehr schnell. Es konnte auch keine positive Blutkultur nachgewiesen werden. Die Temperaturen stiegen ebenfalls nur bis 39° C. Das Interessante an diesem Fall ist die Tatsache, daß hier zur Leberfunktionsstörung noch eine entzündliche Erkrankung kommt, wobei, wie man auch später bei Patienten mit Sepsis sieht, es zu einer deutlichen Erhöhung der Differenz zwischen Cl-INA-Aktivität und Konzentration kommt. Dabei sind die Aktivitäten deutlich unter der Norm. Ebenso zeigen die Gerinnungswerte und das ATIIIpathologische Werte.

Lebersynthesefunktion war mit einem ChE von 1085 bereits erheblich eingeschränkt.

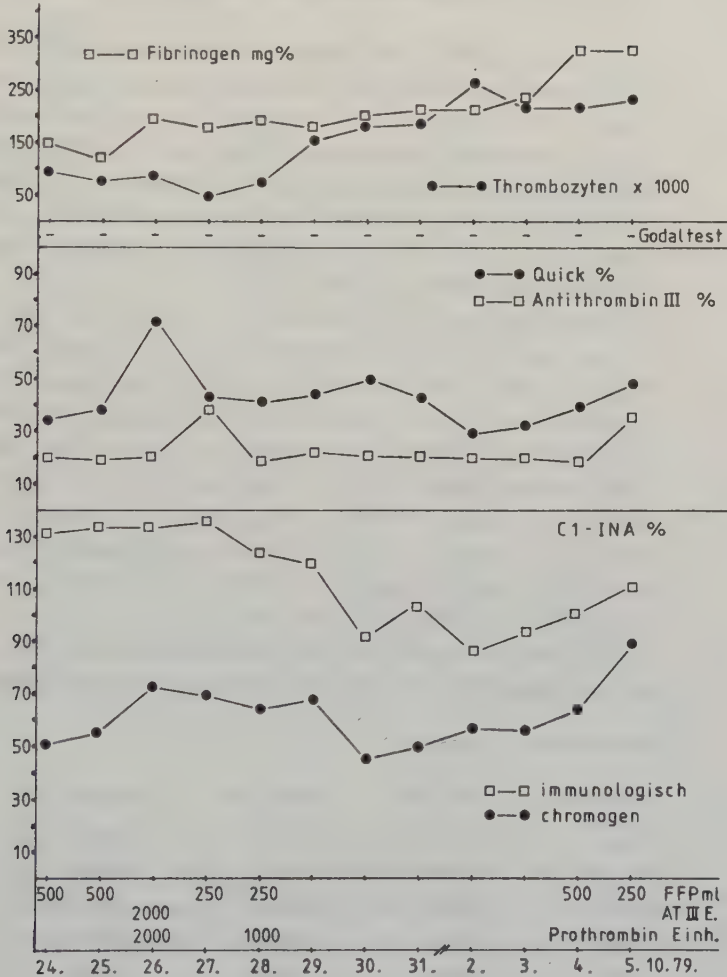
Ansonsten komplikationsloser Verlauf.

Verlauf der Gerinnungsparameter siehe Abb. 6.1.4.3.

Abb. 6.1.4.3.:

Patient O.R., männlich, 51 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



6.2. C1-Inaktivator bei Sepsis

6.2.1. Fälle mit positiver Blutkultur

Diese Gruppe umfaßt 5 Patienten, bei denen, neben dem klinischen Bild und der Temperatur über 39°C, auch die Blutkultur mindestens einmal positiv ausfiel. Die Angaben über die Höhe der C1-INA-Spiegel entsprechen den Durchschnittswerten des Zeitraums der positiven Blutkultur, bzw. der erhöhten Temperatur. Als Krankheitserreger fanden sich: hämolysierende Streptokokken (T.L.), Enterokokken (G.M.), E. coli (M.A., G.M.), Staph. aureus (S.E.), Streptokokken A (G.G.).

Aus der Ergebnistabelle ist ersichtlich, daß nur bei einer Patientin die Aktivitätsspiegel unter dem Normbereich lagen; 2 Pat. zeigten normale, 2 Pat. geringfügig erhöhte Aktivitäten. Die Konzentrationen des C1-INA waren bei 3 Pat. normal, bei 2 Pat. leicht bis stark erhöht. Die Differenzen zeigten zweimal erhöhte, dreimal normale Werte. Im weiteren Verlauf der Erkrankung waren jedoch Einzeldifferenzen bis zu 150 % zu beobachten. Abb. 6.2.1. zeigt in einem Stabdiagramm die durchschnittlichen C1-INA-Werte bei 5 Patienten mit Sepsis. Pat. G.M. wird zusätzlich als Einzelkasuistik dargestellt.

Da bei allen Patienten eine ATIII-Substitution durchgeführt wurde, können keine ATIII-Durchschnittswerte angegeben werden.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Differenz
G.M.	65 %	85 %	20 %
G.G.	121 %	210 %	89 %
T.L.	95 %	140 %	45 %
M.A.	91 %	126 %	35 %
S.E.	120 %	130 %	10 %

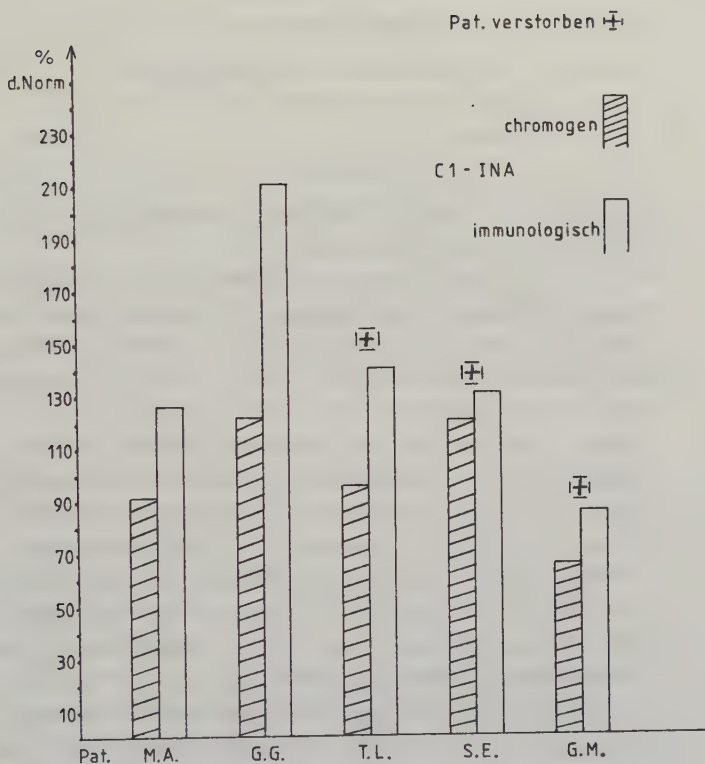


Abb. 6.2.1.

Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte an chromogen, bzw. immunologisch nachgewiesenen C1-INA-Spiegel von 5 Patienten, ermittelt aus den Verlaufswerten während des septischen Zustandes.

6.2.2. Kasuistik eines Patienten mit Sepsis

Patient: G.M., weiblich, 67 Jahre

Diagnose: 1. Endometrium-CaIII; Z.n. Bestrahlung
2. Z.n. akuter Vaginalblutung
3. Sepsis
4. Verbrauchskoagulopathie

Die Patientin war wegen akuter Vaginalblutungen in die I. Univ.-Frauenklinik eingeliefert worden.

Am 24.3.80 wurde die Patientin aufgrund eines ausgeprägten Ikterus in unsere Klinik übernommen. Im weiteren Verlauf stellte sich eine Sepsis, höchstwahrscheinlich ausgehend vom Tumorgebiet, ein, die schließlich zum Tod der Patientin am 7.4.80 führte.

Das Interessante an diesem Fall ist die Tatsache, daß hier Blutproben vor und zu Beginn der Sepsis zur Verfügung standen, während es sich bei allen anderen in dieser Arbeit angeführten Sepsisfälle um bereits ausgeprägte Krankheitsbilder handelt.

Wie aus der Abb. 6.2.2. ersichtlich, stellten sich bei der Patientin am 29.3. septische Temperaturen ein. Die Blutkulturen vom 29.3. und 30.3. zeigten ein Wachstum von Enterokokken und E. coli. Zu diesem Zeitpunkt kam es auch zu Veränderungen im Gerinnungsstatus. Thrombozyten, Fibrinogen und Quickwert fielen ab. Auch der C1-Inaktivator nahm ab, sowohl chromogen, als auch immunologisch. Pathologisch wurden jedoch nur die Aktivitäten an C1-INA. Dieser parallele Verlauf jedoch war bei ausgeprägten Krankheitsbildern nicht zu finden.

6.2.3. Fälle ohne positive Blutkultur

Diese Krankheitsgruppe umfaßt 7 Patienten, bei denen kein Erregernachweis in der Blutkultur gelang. Der Einordnung unter die Diagnose " Sepsis " liegt das klinische Erscheinungsbild zugrunde. Auch hier betrug der Temperaturanstieg mindestens 39°C. Es handelt sich ausschließlich um Patienten, die bereits unter dem septischen Krankheitsbild auf unsere Intensivstation verlegt wurden und z.T. antibiotisch behandelt waren.

Die Angaben über die Höhe der C1-INA-Werte entsprechen wiederum dem Zeitraum des septischen Erscheinungsbildes und stellen Durchschnittswerte dar. ATIII-Werte können wegen der bereits in 6.2.1. erwähnten Substitution nicht angegeben werden.

Bei 5 Pat. fielen z.T. erhebliche Erhöhungen der immunologischen Werte für C1-INA auf, bei 2 Patienten lagen sie im Normbereich. Die Aktivitätswertewaren bei 3 Patienten erhöht, bei 4 Pat. im Normbereich. Die Differenzen zeigen in 6 Fällen eine Erhöhung über den Normbereich.

Bei allen Patienten fanden sich Störungen im Gerinnungsstatus. Abb. 6.2.3. zeigt die Ergebnisse dieser Gruppe in einem Stabdiagramm.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Differenz
L.E.	97 %	177 %	80 %
B.F.	85 %	130 %	45 %
S.M.	112 %	161 %	49 %
S.J.	131 %	185 %	54 %
B.H.	122 %	212 %	90 %
S.K.	130 %	268 %	138 %
A.J.	77 %	103 %	26 %

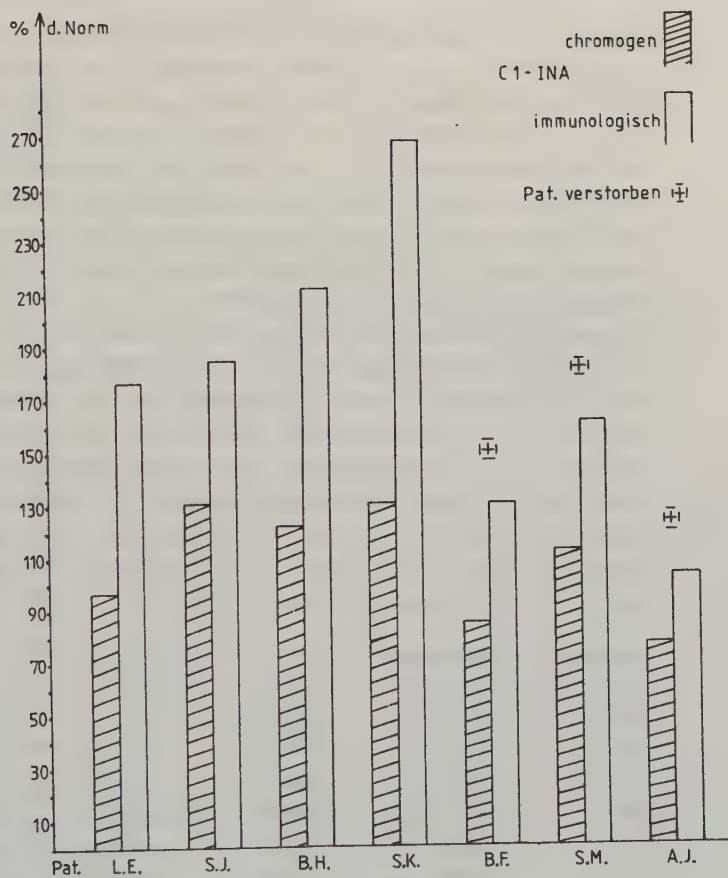


Abb. 6.2.3.

Darstellung der Durchschnittswerte an C1-INA-Plasmaspiegel bei 7 Patienten mit septischem Zustandsbild.

6.3. C1-Inaktivator bei Pneumonie

Diese Gruppe besteht aus 10 Patienten, deren Hauptgrund für den Intensivaufenthalt, neben anderen Entzündungen, eine Pneumonie darstellte. Der Schweregrad der Pneumonie erstreckt sich von leicht verlaufenden (N.N.) bis zu schwersten Fällen, die schließlich ad exitum führten (H.A., S.A., S.M.). Es zeigte sich, daß bei 3 Patienten mit schwerer, zum Tode führender Pneumonie die C1-INA-Aktivitäten und die ATIII-Aktivitäten z.T. deutlich erniedrigt waren. Die Differenz zu den erhöhten immunologischen C1-INA-Werten zeigt sich deutlich vermehrt.

Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten an C1-INA und überwiegend auch die ATIII-Aktivität bei den restlichen 7 Patienten im Normbereich. Die Differenzen waren im Normbereich oder mittelgradig erhöht. 5 der 7 Patienten überlebten ihre Pneumonie, 2 verstarben, wobei ein Pat. K.M. den Komplikationen von Herzrhythmusstörungen erlag. Abb. 6.3. zeigt diese Krankheitsgruppe in einem Diagramm, unterteilt in eine Gruppe mit erniedrigtem ($n = 3$) C1-INA und im Normbereich befindlichem C1-INA mit den dazugehörigen ATIII-Aktivitäten und C1-INA-Konzentrationen.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Differenz	ATIII
K.M.	150 %	186 %	36 %	71 %
K.L.	116 %	152 %	36 %	95 %
S.Au.	100 %	138 %	38 %	93 %
B.	100 %	144 %	44 %	94 %
G.M.	80 %	130 %	50 %	-
N.N.	100 %	180 %	80 %	68 %
R.A.	100 %	144 %	44 %	73 %
S.M.	76 %	172 %	96 %	38 %
S.A.	70 %	144 %	74 %	68 %
H.A.	68 %	166 %	98 %	30 %

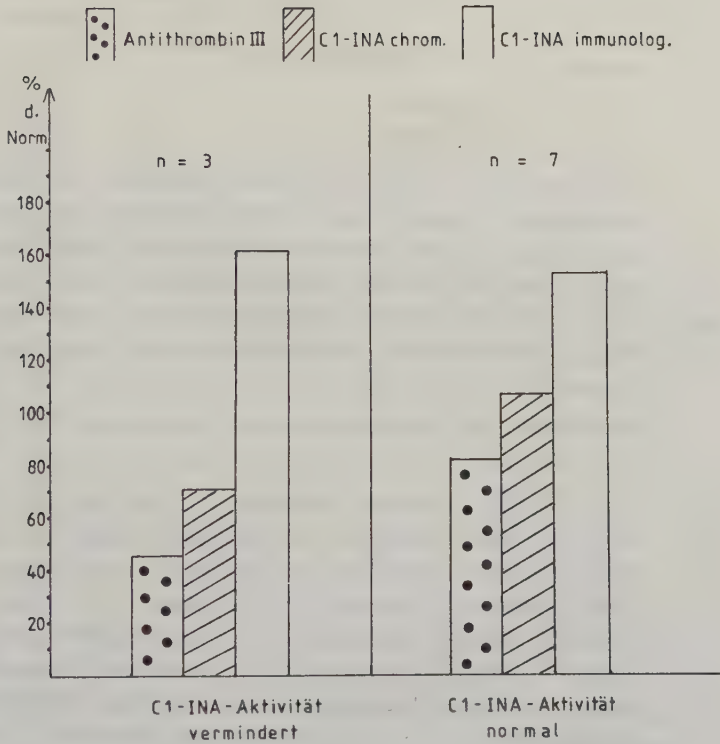


Abb. 6.3.:

Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte der C1-INA-Spiegel, aufgeteilt in erniedrigte und normale C1-INA-Aktivitäten, mit den dazugehörigen durchschnittlichen ATIII-Aktivitäten.

6.3.1. Kasuistik von 2 Patienten mit schwerer Pneumonie

Patient 1: H.A., männlich, 66 Jahre

Diagnose: 1. Pneumonie

2. Z.n. Reanimation

Der Patient war am 22.10.79 im Rahmen eines Herz- und Kreislaufstillstandes reanimiert und auf unsere Intensivstation gebracht worden. Die klinische Untersuchung ergab eine Zyanose, Kachexie, und eine diffuse Pneumonie beidseits. Röntgenologisch bestätigte sich der Verdacht. Bakteriologisch ergab sich in den entsprechenden Abstrichen Wachstum von Pneumokokken nebst Klebsiella pneumoniae und Staph. aureus.

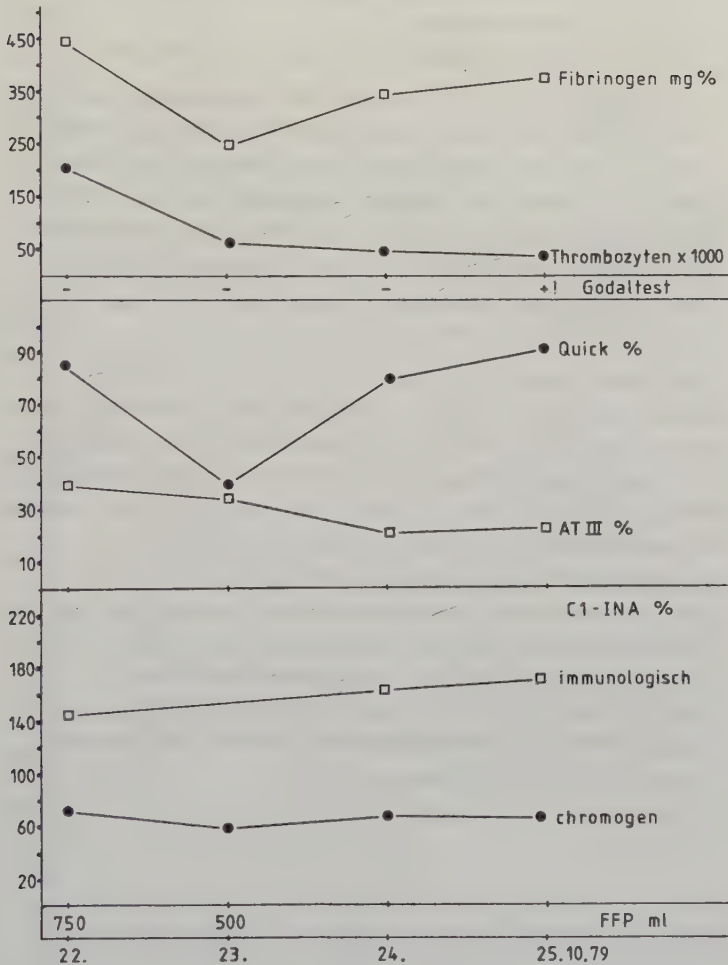
Die pulmonale und kardiale Situation verschlechterte sich sehr rasch und der Patient verstarb am 25.10.79.

Den klinischen Verlauf der Laborparameter zeigt die Abb. 6.3.1.1. Für die C1-INA-Aktivitäten zeigt sich eine Verminderung z.T. auf 60 %, während die Differenz zum immunologischen Nachweis erhöht ist z.T. auf 100 %. Die Werte für ATIII waren mit 39 % bzw. 35 % ebenfalls stark erniedrigt, so daß aus dieser Konstellation bereits an einen Inhibitorverbrauch im Gerinnungssystem gedacht werden muß. Der Gerinnungsstatus zeigt ebenfalls Veränderungen, besonders am 23.10. (Quick, Thrombinzeit, Thrombozyten, Fibrinogen, PTT), wobei am 25.10. auch der Godaltest positiv ausfiel. Dieses Bild spricht wohl für zunehmende Gerinnungsaktivierung, wobei jedoch das Ausmaß dieser Thrombophilie dahingestellt sei.

Abb. 6.3.1.1.

Patient H.A., männlich, 66 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



Patient 2: S.A., männlich, 80 Jahre

Diagnose: 1. Pneumonie - Langzeitbeatmung

2. Urethritis, Epididymitis

3. Shunt-Infektion

4. Z.n. galliger Peritonitis u. OP am 27.9.79

Der Patient war am 27.9. wegen einer Gallensteinperforation operiert worden und wurde nun aufgrund Überwiegender internistischer Probleme am 6.11. auf unsere Intensivstation übernommen. Im Vordergrund stand das infektiöse Bild einer Pneumonie, Urethritis, Epididymitis, Shunt-Infektion und beginnender Infektion der Wunden. Als Erreger wurden hauptsächlich Staph. aureus und Pseudomonas aeruginosa nebst Proteus morganii und Enterokokken gefunden.

Im weiteren Verlauf zeigte sich trotz Einsatz verschiedenster Antibiotika keine wesentliche Besserung, Immer wieder kam es zu Fieberanstiegen bis etwa 39°C und schließlich zu einer zunehmenden Verschlechterung der Nierenfunktion, die aufgrund der schlechten Allgemeinlage des Patienten nicht mehr durch Dialyse überbrückt wurde. Der Patient verstarb am 23.11.79.

Den Verlauf der Laborparameter zeigt die Abb. 6.3.1.2.

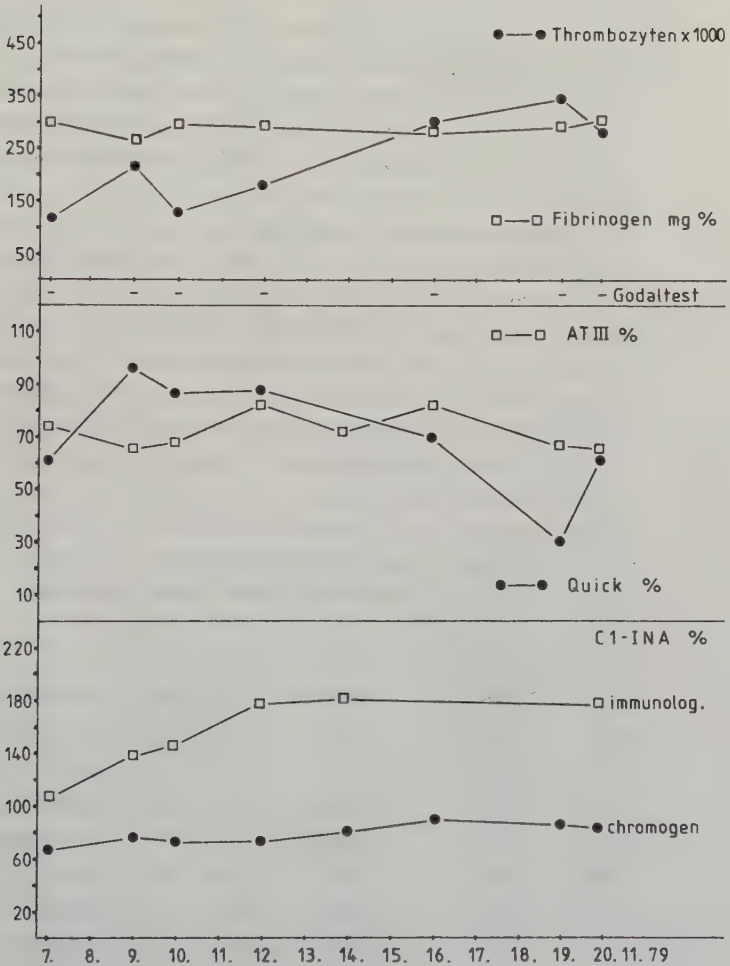
Auch hier waren die Cl-INA-Aktivitäten z.T. erniedrigt, während die Differenzen zu den immunologischen Werten wiederum bis zu 100 % betrugen. ATIII war z.T. geringfügig erniedrigt.

Ansonsten ließ sich jedoch anhand des Gerinnungsstatus keine ernstere Störung im Gerinnungsablauf erkennen. Auch klinisch ergaben sich keine Anhaltspunkte hierfür.

Abb. 6.3.1.2.

Patient S.A., männlich, 80 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



6.4. C1-Inaktivator bei Allgemeininfektionen, unklarem Fieber und Entzündungen

Diese Gruppe umfaßt 14 Patienten. Die Krankheitsbilder bestehen aus Infektionen und Entzündungen verschiedenster Genese und Ausprägung, bis hin zu nicht geklärten, hohen Fieberzuständen. Als Ergebnis zeigt sich bei 3 Patienten eine Erniedrigung der C1-INA-Aktivität bei normaler bzw. gering erniedrigter Konzentration und nicht erhöhter Differenz.

Der Krankheitsbeginn war dabei mehr oder weniger akut, mit hohem ungeklärtem Fieber (B.E., J.H.) bzw. einer Endokarditis (W.A.). ATIII war in 1 Fall erniedrigt (J.H.).

Bei den übrigen 11 Patienten zeigten sich normale C1-INA-Aktivitäten, bei z.T. stark erhöhten Konzentrationen. ATIII überwiegend im Normbereich. Im Gegensatz zu den ersten 3 Pat. handelt es sich hier um vorwiegend chronische oder über längere Zeit andauernde Zustände (siehe Ergebnistabelle). Sonst bestanden keine wesentlichen klinischen Unterschiede.

Ein Zusammenhang von C1-INA-Aktivitäten mit bestimmten Erkrankungen war in dieser Gruppe nicht ersichtlich.

Abb. 6.4. zeigt die Ergebnisse dieser Gruppe graphisch.

Ergebnisse im einzelnen:

Pat.	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Diff.	ATIII	Diagnose
B.E.	51 %	62 %	11 %	78 %	unklares Fieber
J.H.	66 %	82 %	16 %	59 %	unklares Fieber
W.A.	68 %	100 %	32 %	105 %	Endokarditis
K.S.	93 %	94 %	1 %	78 %	Perikarditis
P.He.	118 %	118 %	0 %	86 %	Cholelithiasis
F.J.	81 %	136 %	55 %	-	Cholangio-Sepsis?
H.	90 %	180 %	90 %	90 %	Bauchwandabszeß
H.A.	90 %	160 %	70 %	98 %	unklares Fieber

Pat.	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Diff.	ATIII	Diagnose
H.Em.	91 %	148 %	57 %	65 %	Katheterinf., Bronchitis
H.El.	100 %	180 %	80 %	123 %	Pericarditis, Urämie
L.H.	92 %	136 %	44 %	75 %	rheumat. Karditis
T.T.	89 %	144 %	55 %	113 %	Pericarditis, Urämie
T.R.	100 %	180 %	80 %	125 %	Pericarditis
B.E.	80 %	125 %	45 %	39 %	Pneumonie Peritonitis

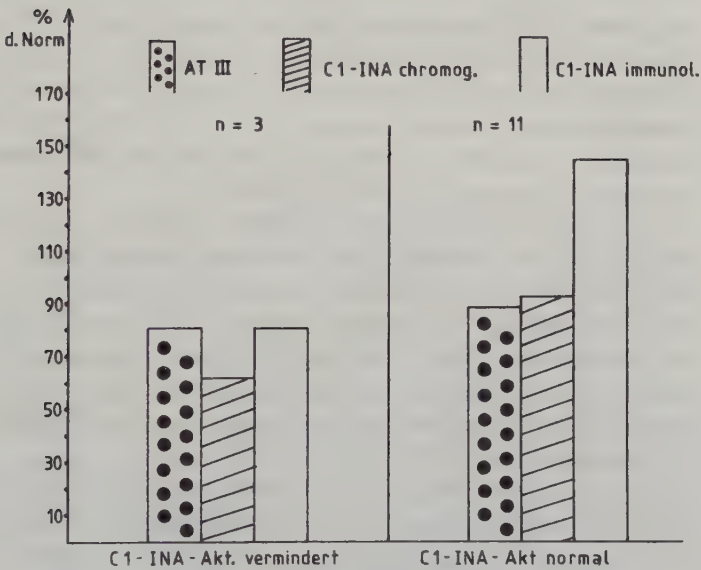


Abb. 6.4.:

Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte an C1-INA und ATIII der Patienten mit allgemeinen Entzündungen, aufgeteilt in erniedrigte und normale C1-INA-Aktivitäten.

6.5. C1-INA bei Lungenembolie

Es handelt sich hier um 9 Patienten. Die Schwierigkeiten bestehen in dieser Gruppe darin, die gefundenen Laborwerte für C1-INA in Beziehung zu bringen mit dem Ereignis der Lungenembolie (Zeitpunkt) und der Grundkrankheit. So konnte bei 2 Patienten (Z.R., G.J.), bei denen das Ereignis während des Klinikaufenthaltes ablief, eine deutliche Veränderung im Gerinnungssystem und in der C1-INA-Aktivität gefunden werden. (Darstellung als Kasuistik!).

Bei einer Patientin, die auffallend niedrige C1-INA-Aktivitäten über eine längere Zeit aufwies, jedoch einschneidende Veränderungen im Gerinnungssystem oder anderen Laborparametern vermissen ließ, lag eine Schwangerschaft vor. Da dies der einzige Fall einer Schwangerschaft im Untersuchungsgut war und somit keine Vergleichsergebnisse vorhanden sind, ist die Beurteilung, was den Zusammenhang mit der Lungenembolie betrifft, schwierig.

Bei einer Patientin lagen Leberenzymwerte von GOT: 1170 und GPT: 300 U/l vor, die im Rahmen einer Schockleber gedeutet wurden. Auch hier sind die Veränderungen der C1-INA-Aktivitäten, die nach dem vermuteten Ereignis erniedrigt waren (70 %), um dann im weiteren Verlauf auf Werte von über 160 % anzusteigen, wohl nicht eindeutig nur auf das Ereignis der Lungenembolie zu beziehen, wenn man die Bedeutung der Leberfunktion (siehe dort) für die C1-INA-Spiegel bedenkt.

5 Patienten zeigen normale bis geringfügig erniedrigte (K.K. 73 %) C1-INA-Aktivitäten, wobei bei einer Patientin (G.E.) klinisch zwar ein Morbus Embolicus mit dem laborchemischen Bild einer Verbrauchskoagulopathie imponiert, der Zeitpunkt der Embolie jedoch nicht eruierbar ist, bzw. mehrere Tage vor Aufnahme in unsere Klinik gelegen sein mußte, so daß sich eventuell veränderte C1-INA-Werte inzwischen normalisiert haben können. Abb. 6.5.1. zeigt die Ergebnisse in einem Stabdiagramm.

Die Plasmaproben entstammen dem gleichen bzw. den darauffolgenden Tagen.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Diff.	ATIII	Urs. d. Emb.
K.K.	73 %	96 %	23 %	53 %	?
K.S.	53 %	100 %	47 %	73 %	Thrombophleb. Bein
S.J.	77 %	98 %	21 %	78 %	?
W.R.	97 %	150 %	53 %	85 %	postoperativ
G.E.	94 %	116 %	22 %	61 %	M. Embolicus
K.R.	70 %	196 %	126 %	115 %	?
Z.V.	83 %	120 %	37 %	75 %	Beckenvenen- thromb.
Z.R.	69 %	108 %	39 %	58 %	intraoperativ
G.J.	62 %	98 %	36 %	40 %	hyperkoag. ?!

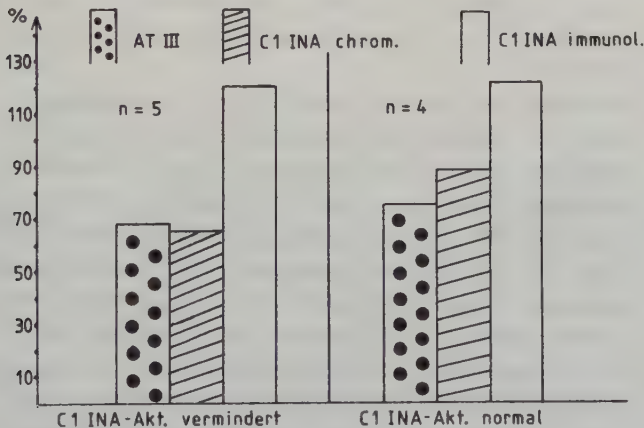


Abb. 6.5.:

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der C1-INA-Werte, aufgeteilt in erniedrigte C1-INA-Aktivität (n = 5) und normale C1-INA-Aktivität (n = 4), bei 9 Patienten mit Lungenembolie.

6.5.1. Kasuistik von 2 Patienten mit akuter, fulminanter Lungenembolie

Patient 1: Z.R., weiblich, 52 Jahre

- Diagnose: 1. Z.n. beginnender Urosepsis bei Nierenbeckenstein;
2. fulminante Lungenembolie
3. Varikosis beider Beine; rez. Ulcera duodeni

Seit Dez. 79 traten bei der Patientin Mikrohämaturien auf. Es wurde ein Nierenbeckenventilstein festgestellt und die Pyelolithotomie am 12.2.80 eingeleitet. Bei Umlagerung auf dem OP-Tisch trat eine fulminante Lungenembolie auf: plötzlicher RR-Abfall auf 70mmHg, Zyanose, Halsvenenstau mit einem zentralen Venendruck von +30 cm, im EKG Zeichen der Rechtsherzbelastung mit passagerem Rechtsschenkelblock. Nach Anlegen einer Ureterschiene wurde die Patientin zur Stabilisierung der cardio-pulmonalen Situation auf unsere Intensivstation übernommen. Die Patientin mußte bei uns über 8 Tage beatmet werden. Unter Antibiotikatherapie und Heparin stabilisierten sich Herz- und Kreislaufverhältnisse. Fieber konstant um 38°C, kein Erregernachweis.

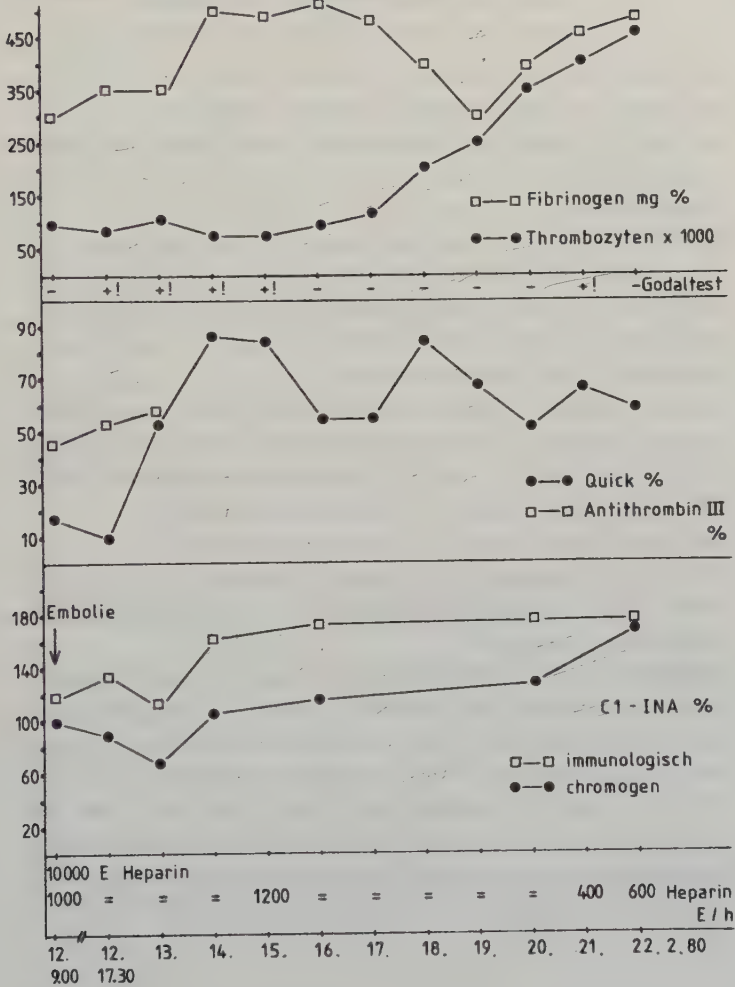
Phlebographisch ergab sich kein Anhalt für einen Streuherd, im Thorax p.a. keine Zeichen einer Infarktpneumonie oder eines segmentalen Ausfalles. Die Pat. erholte sich zunehmend.

Laborchemisch waren vor allem die Veränderungen des Gerinnungsstatus nach dem Embolieereignis bemerkenswert: Abfall des Quickwertes, Verlängerung von Thrombinzeit und PTT, niedrige Thrombozyten und ein positiver Godaltest über 4 Tage. Entsprechend fiel die Aktivität des C1-INa innerhalb eines Tages von 100 % auf 69 %, um am 3. Tag wieder auf 103 % anzusteigen. Die sich sehr schnell normalisierende Aktivität des C1-INa weist auf die enorme Regenerationsfähigkeit dieses Systems hin. Für den erheblich gesteigerten Umsatz spricht der Anstieg der immunologisch nachweisbaren Konzentration auf über 170 % (Ausgangswert 120 %).

Abb. 6.5.1.1.

Patient Z.R., weiblich, 52 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



Patient 2: G.J., männlich, 68 Jahre

Diagnose: 1. rez. Lungenembolien mit Lungenödem und Schocklunge
2. diabetische Mikro- und Makroangiopathie
3. diabetische Nephropathie mit Niereninsuffizienz

Der Patient verspürte seit 16.1.80 Ruhe-Angina, Ruhe-Dyspnoe und Orthopnoe, und wurde deshalb stationär eingewiesen.

Auf unserer Intensivstation wurde der Patient unter der Arbeitsdiagnose Herzinfarkt behandelt, obwohl im EKG sich kein Infarkthinweis fand.

In der Nacht zum 20.1. kam es zu einer Tachycardie, gefolgt von einer Bradyarrhythmie, Patient nicht ansprechbar, RR um 40 mmHg systolisch, massive Cyanose, Zentralisierung, PO_2 40, PCO_2 46. Nach Intubation und Beatmung mit 100 % Sauerstoff, sowie einem PEEP von 6 lediglich Aufsättigung auf ein PO_2 von 65, was den Verdacht auf eine Lungenembolie nahelegte. Patient wurde dann wieder ansprechbar. Ein ähnliches Ereignis trat am gleichen Tag nochmal auf. Am 21.1. kam es zu einem erneuten Schock-Ereignis mit nachfolgendem Fieber und Pneumonie rechts basal.

Der Patient starb am 29.1. im kardiogenen Schock.

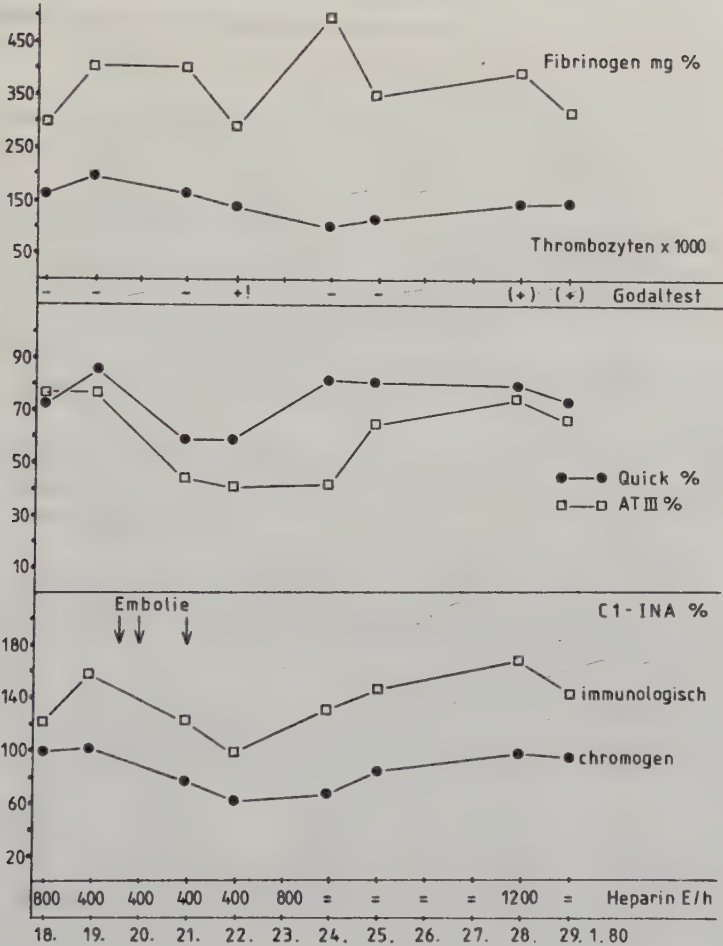
Die Sektion erbrachte einen frischeren wandadhärenten Thrombembolus im rechten Lungenunterlappen, sowie einzelne frische periphere Emboli beidseits.

Todesursache war ein Herzinfarkt, verbunden mit einer Lungenembolie als Ursache der 3 Schockereignisse. Gerinnungsanalytisch zeigt sich im Zeitraum dieser Ereignisse eine Abnahme des Quickwertes auf 58 %, eine geringe Zunahme der Thrombinzeit auf 13,6s (21.1.) und der PTT auf 50,9 (21.1., von 39,4 am 19.1.) und ein positiver Godaltest am 22.2. . Es kam zu einem Absinken der C1-INA-Aktivität von 100 % (19.1.) auf 62 % (22.1.) und der ATIII-Aktivität von 76 % (19.1.) auf 40 % (22.1.)

Abb. 6.5.1.2.

Patient G.J., männlich, 68 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



6.6. C1 - Inaktivator bei akuter Pankreatitis

Unter diesem Krankheitsbild wurden 4 Patienten auf ihren Plasmaspiegel an C1-INA untersucht. Die Diagnose einer akuten Pankreatitis war bei allen 4 Patienten klinisch, laborchemisch und sonographisch gesichert.

Bei 3 Patienten (S.L., B.K., B.G.) dauerten die Beschwerden schon längere Zeit an (S.L., B.K.), bzw. war bereits eine Vorbehandlung in einem Krankenhaus erfolgt (B.G.). Der 4. Patient kam bereits am Tag des Krankheitsbeginns in unsere stationäre Behandlung (J.E.).

Als Ergebnis der C1-Inaktivator-Spiegel läßt sich feststellen, daß bei den 3 erstgenannten Patienten die Aktivität 2-mal im Normbereich lag, einmal stark erhöht war, während die Konzentrationen einmal im Normbereich (B.K.) und zweimal erhöht waren (S.L., B.K.).

Im Gegensatz dazu fiel bei dem Patienten J.E. eine deutliche Erniedrigung der Aktivität unter 20% auf. Sogar die Konzentration war hier zu Beginn, mit 62%, unter den Normbereich gefallen (Darstellung als Kasuistik).

Gerinnungsanalytisch zeigte lediglich eine Pat. S.L. im weiteren Verlauf geringe Veränderungen, sonst waren keine pathologischen Befunde zu erheben.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Differenz%	ATIII%
S.L.	100%	200%	100%	61
B.G.	172%	200%	28%	128
B.K.	91%	98%	7%	83
J.E.	10%	62%	52%	75

6.6.1. Kasuistik eines Patienten mit akuter Pankreatitis

Patient: J.E., männlich 34 Jahre

Diagnose: Akute Pankreatitis

Der Patient kommt wegen heftigster Schmerzen, vom Nabel ausgehend und in den Rücken und linke Schulter ausstrahlend, in stationäre Behandlung. 1978 war bereits einmal eine Pankreatitis aufgetreten. Sonst sei der Patient immer gesund gewesen. Keine Alkoholanamnese.

Laborchemisch fiel eine Leukozytose von 19400, eine Lipase von 2065 U/l, Bili.ges. 1,68 mg% und ein Ca von 3,7 mval/l auf. Alle sonstigen Laborbefunde im Normbereich, einschließlich des Gerinnungsstatus.

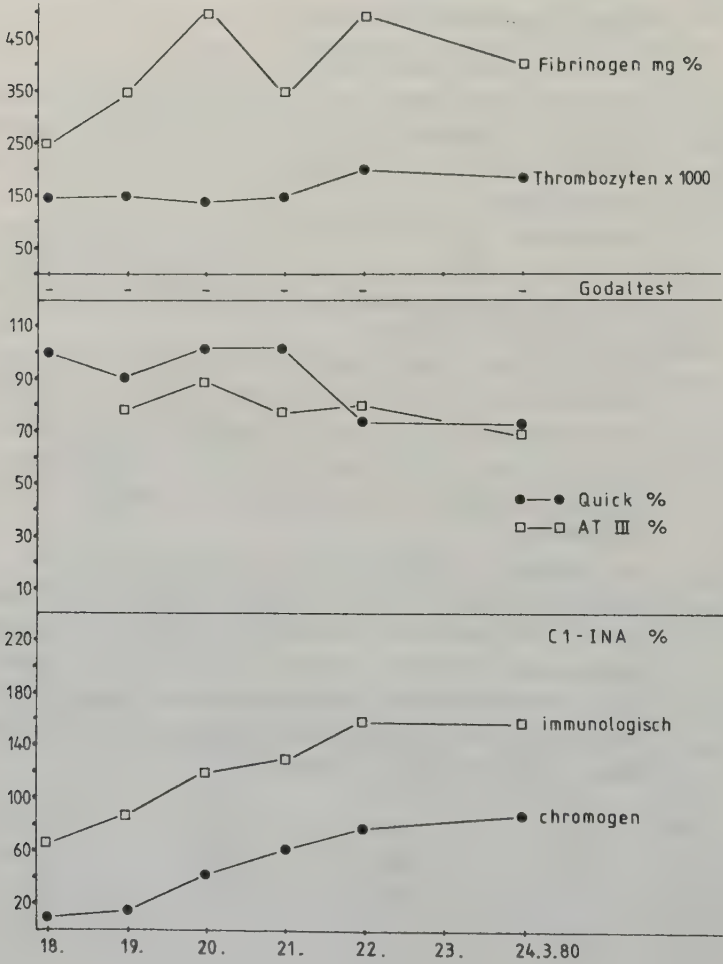
Die anfänglichen hohen Temperaturen von 40,5°C fielen rasch, um im weiteren Verlauf wieder auf 39°C anzusteigen. Unter der üblichen Therapie kam es zu einem deutlichen Abfall der Lipase. Ab der 3. Woche besserte sich das Zustandsbild des Patienten zunehmend. Bei Entlassung war der Patient völlig beschwerdefrei.

Die Cl-Inaktivator-Aktivität zeigt einen Abfall auf 10% während der akuten Phase am 2. Krankheitstag. Auch der immunologische Wert des Cl-INA war unter den Normbereich abgefallen. Er betrug am 2. Tag 62%, um dann jedoch sehr schnell wieder in den Normalbereich und schließlich darüber hinaus anzusteigen. Die Aktivität benötigte im Gegensatz dazu etwa eine Woche, um sich wieder zu normalisieren.

Abb. 6.6.1.

Patient: J.E., männlich, 34 Jahre

klinischer Verlauf der Gerinnungsparameter



6.7. C1 - Inaktivator bei Malaria

3 Patienten wurden zu dieser Fragestellung untersucht.

Die Diagnose war bei allen Patienten durch Erregernachweis gesichert. Es handelt sich um 2 Fälle einer Malaria tropica und um einen Fall einer Malaria tertiana und falciparum (T.T.). Die Patienten kamen im Fieberschub in die Klinik.

In den ersten beiden Fällen einer M. tropica zeigte sich eine Erhöhung der C1-INA-Konzentrationen, wobei die Aktivität in einem Fall erhöht (O.M.), im zweiten Fall normal ausfiel (V.H.). Gerinnungsanalytisch fanden sich ausgeprägte Thrombozytopenien mit 30.800 (O.M.) und 58.300 (V.H.). Sonst zeigten sich keine wesentlichen pathologischen Gerinnungswerte. Beim dritten Patienten (T.T.) fand sich eine ausgesprochene Erniedrigung der C1-INA-Aktivität, bei normaler Inhibitor-konzentration. Auch hier war gerinnungsanalytisch lediglich eine Thrombozytopenie mit 63.800 zu finden.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Differenz	ATIII%
O.M.	140%	182%	42%	81
V.H.	95%	180%	85%	108
T.T.	15%	78%	63%	-

6.8. C1-Inaktivator bei Typhus abdominalis

2 Patienten mit dieser Diagnose fielen in unser Untersuchungs-
gut. Dabei war *Salmonella typhi* sowohl im Blut, als auch im
Stuhl nachgewiesen. Ansonsten war der Krankheitsverlauf in
beiden Fällen komplikationslos.

Die Konzentrationen an C1-Inaktivator waren in beiden Fällen
stark erhöht und stiegen im Verlauf der Erkrankung von einem
Anfangswert von 190% auf 240% an.

Die Aktivitäten lagen mit 116% und 120% zu Beginn an der oberen
Normgrenze, um diese dann im Verlauf der Krankheit mit 150%
bzw. 160% zu überschreiten. Differenz erhöht.

Gerinnungsanalytisch war in einem Fall lediglich eine Thrombo-
zytopenie von 91.300 (S.D.) zu finden, sonstige Parameter
normal. Bei dem Patienten Z.W. zeigte sich ein einmalig er-
niedrigter Quick von 59% und eine geringe Thrombozytopenie von
136.400, sonstige Werte normal.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	C1-INA chr.	C1-INA imm.	Differenz	ATIII%
Z.W.	120%	186%	66%	73
S.D.	116%	194%	78%	95

6.9. Cl-Inaktivator bei Malignom

In dieser Gruppe befinden sich 3 Patienten. Es handelt sich um fortgeschrittene Tumoren mit Einbruch in das Nachbargewebe (G.M.), bzw. mit nachgewiesenen Metastasen (F.J., H.G.) (Malignomart siehe Ergebnistabelle).

Die Cl-Inaktivator-Aktivität war bei 2 Patienten (F.J., H.G.) erniedrigt, während sie beim 3. Pat. im Normbereich lag. Die Konzentration bei H.G. im oberen Normbereich, während sie bei F.J. und G.M. über die Norm erhöht war.

Gerinnungsanalytisch läßt sich feststellen, daß bei 2 Pat. (F.J., G.M.) der Godaltest in diesem Zeitraum positiv, bei H.G. schwach positiv ausfiel. Der Quickwert war bei allen 3 Patienten unter die Norm erniedrigt. Die Thrombozytenzahl war bei G.M. auf 80.000 erniedrigt.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	Cl-INA chr.	Cl-INA imm.	Diff.	ATIII%	Diagnose
F.J.	58%	174%	116%	-	metast.Pro- statacarcinom
H.G.	65%	122%	57%	65	metast.Adeno- Ca der Nieren
G.M.	84%	152%	68%	38	Endometrium- Ca + Rectum- infiltration

6.10. Cl-Inaktivator bei Herzerkrankungen

Diese Krankheitsgruppe umfaßt 14 Patienten mit leichteren bzw. schwereren Herzerkrankungen. Beeinflussungen auf das Hämostase- bzw. Complementsystem waren jedoch hier nicht vorhanden, so daß dieses Kollektiv mehr oder weniger als Kontrollgruppe von "normalen" Intensivpatienten dient. Es zeigte sich, daß die Cl-INA-Konzentrationen alle im Normbereich zu finden waren. Die Aktivitäten waren lediglich bei 3 Patienten mit 72%, 75% und 76% geringfügig unter die Norm von 77% erniedrigt. Die Differenz lag mit maximal 36% bei allen Patienten im Normbereich.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	Cl-INA chr.	Cl-INA imm.	Diff.	ATIII%	Diagnose
B.G.	94%	122%	28%	90	Angina pectoris
B.	83%	84%	1%	53	Herzrhythmusstör.
C.P.	85%	121%	36%	-	Herzinfarkt
D.S.	86%	120%	34%	101	Ventr.Tachykard.
D.H.	90%	80%	10%	-	Herzinfarkt
D.K.	72%	78%	6%	-	Herzinfarkt
H.A.	90%	122%	32%	86	Koronare Herzerk.
K.R.	83%	96%	13%	108	Herzinfarkt (VW)
K.E.	87%	92%	5%	63	KHE,Reinfarkt
M.E.	92%	126%	34%	64	KHE,Emphysem
O.	89%	120%	31%	125	Herzinf.,kardiog. Schock
R.	75%	90%	15%	75	KHE,instab.Angina pectoris
W.	78%	98%	20%	54	Herzinf.,(HW)
L.	76%	92%	16%	103	KHE,Herzinf.,

7. C1-Inaktivator bei systemischen Thrombolyse

Um diesen Differenzzuwachs zwischen Aktivität und Konzentration von C1-Inaktivator bei einem akuten Verbrauch des Inhibitors, wie wir es bei den bisherigen Ergebnissen gesehen haben, quasi in einem "in vivo" Versuch zu verifizieren, führten wir unsere Bestimmung bei 3 Patienten mit thrombolytischer Therapie durch. Bei dieser Aktivierung des Fibrinolyse-Systems kommt es in der ersten Zeit in der Regel zu einer ausgeprägten Plasminämie (72). Da der C1-Inaktivator auch ein Inhibitor des Plasmins und von Plasminogenaktivatoren (35,60) ist, müßte es zu einem nachweisbaren Abfall der C1-INA-Aktivität kommen, während sich die Konzentration des Eiweißmoleküls in keinem größeren Umfang ändern dürfte.

C1 - Inaktivator - Bestimmungen während Thrombolyse

(Δ immunolog. Konzentration, $\blacktriangle$ Aktivitätsbestimmung; chromog.S.)

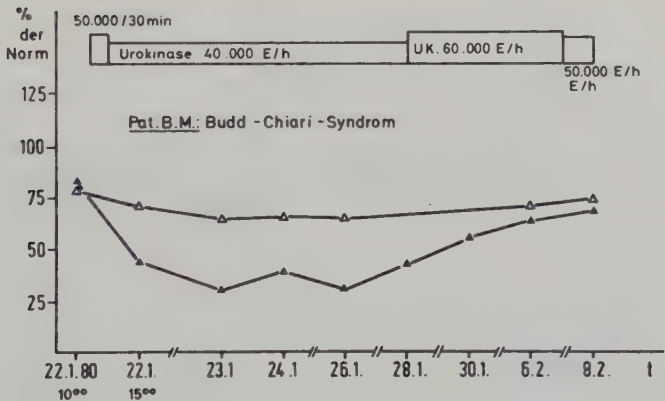


Abb. 7.1.

Harpel (30) beschreibt die Möglichkeit, daß Plasmin den C1-INa proteolytisch zerstört.

1 Patientin wurde dabei mit Streptokinase, 2 Patienten mit Urokinase therapiert. Den Verlauf des C1-Inaktivators bei dieser Behandlung zeigen die Abb. 7.1. - 7.3.

C1-Inaktivator-Bestimmungen während Thrombolyse

(Δ immunolog. Konzentration, $\blacktriangle$ Aktivitätsbestimmung; chromog. S.)

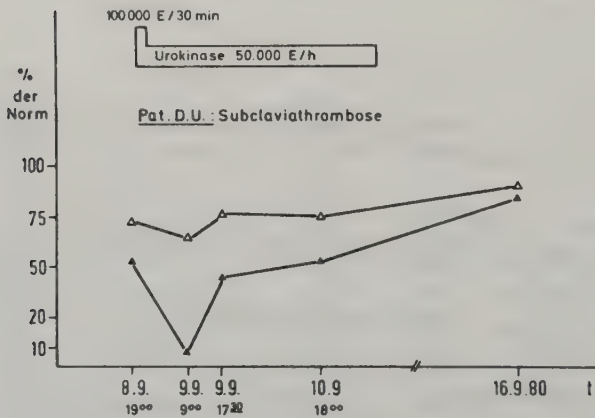


Abb. 7.2.

Abb. 7.1. zeigt eine Patientin mit einem Budd-Chiari-Syndrom. Während der Urokinasetherapie unter der angegebenen Dosierung kam es zu einem deutlichen Abfall der C1-Aktivität von etwa 80% als Ausgangswert auf etwa 30% nach einem Tag. Die Abnahme der Konzentration war hingegen wesentlich geringer ausgeprägt (von etwa 78% auf ca. 68%).

C1-Inaktivator-Bestimmungen während Thrombolyse

(Δ immunolog. Konzentration, $\blacktriangle$ Aktivitätsbestimmung; chromog.S.)

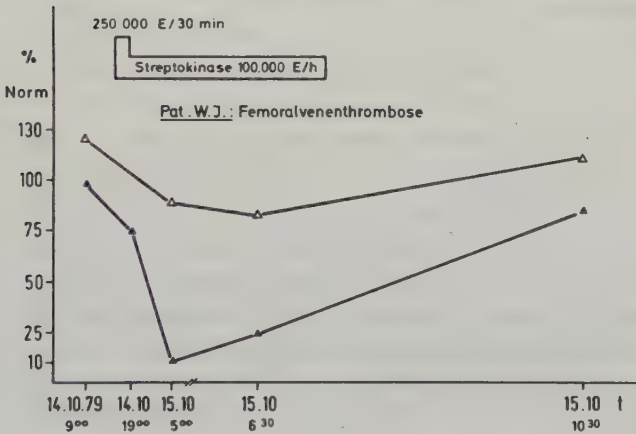


Abb. 7.3.

Abb. 7.2. läßt einen derartigen Aktivitätsverbrauch bei einer Patientin mit Subclaviathrombose erkennen. Zu Beginn der Urokinasetherapie fällt der Cl-INA-Aktivitätsspiegel auf 10 % der Norm ab. Die Abnahme der Cl-INA-Konzentration ist dabei unerheblich.

Abb. 7.3. verdeutlicht diesen Sachverhalt noch einmal bei der Streptokinasetherapie einer Femoralvenenthrombose. Zwar nahm auch die Konzentration hier um 30 % ab, von 120 % auf 90 %, der Aktivitätsverlust betrug jedoch 90 % (Abnahme von 100 % auf 10 % der Norm).

Zu beachten ist, daß nach Absetzen der Therapie die Cl-INA-Aktivität innerhalb von Stunden wieder an die untere Normgrenze ansteigt.

8. C1-Inaktivator bei Hämo-separation

Die C1-INA Bestimmung wurde hier bei 3 Patienten durchgeführt. Diese Therapie wurde notwendig, als es bei den Patienten zu einem krisenhaften Zustand ihrer schweren Grunderkrankung kam. Es handelt sich um 2 Fälle einer Thyreotoxikose und um einen Fall einer Myasthenia gravis.

Für die Untersuchung an diesem Patientengut gab es zwei Überlegungen: einerseits sollte es sich zeigen, ob es bei diesem therapeutischen Vorgehen zu einem Verbrauch von Gerinnungspotential, v.a. von C1-INA-Aktivität kommt; andererseits, sofern dies nicht der Fall sein sollte, ob es bei einer Verminderung von Plasmabestandteilen, v.a. Inhibitorproteinen, durch die Hämo-separation auch zu einer entsprechenden Verminderung der dazugehörigen Aktivität kommt. Dies sollte u.a. auch ein Beleg dafür sein, daß durch die beiden Bestimmungsmethoden der gleiche Plasmafaktor dokumentiert wird, wie es für ein Normalplasma bereits unter 5.1. gezeigt wurde.

Die Abbildungen 8.1. - 8.3. zeigen den Verlauf des C1-Inaktivators bei insgesamt 7 Hämo-separationen.

Es läßt sich erkennen, daß es in allen 7 Fällen zu einer gleichförmigen Abnahme beider Bestimmungswerte kommt. Ein isolierter Verbrauch an C1-INA-Aktivität, entsprechend einer DIC, mit einer Zunahme der Differenz zwischen beiden Methoden, zeigt sich hier nicht.

Abb. 8.1.

Cl-INA bei Hämostepparation; Pat.: K.A.

Diagnose: Myasthenia gravis

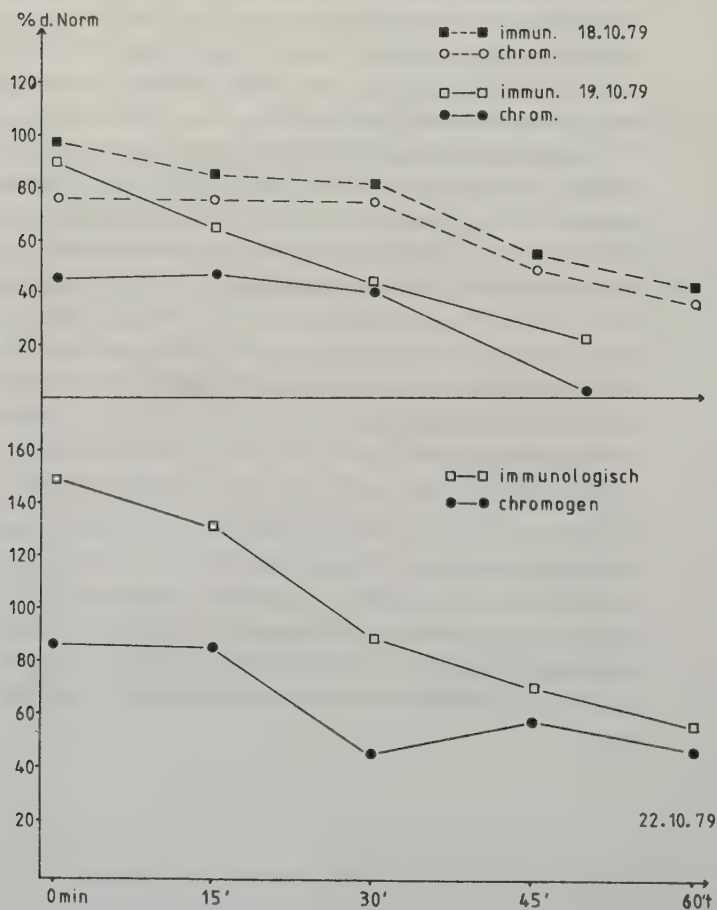


Abb. 8.2

C1-INa bei Hämoseparation; Pat.: S.J.

Diagnose: Thyreotoxikose

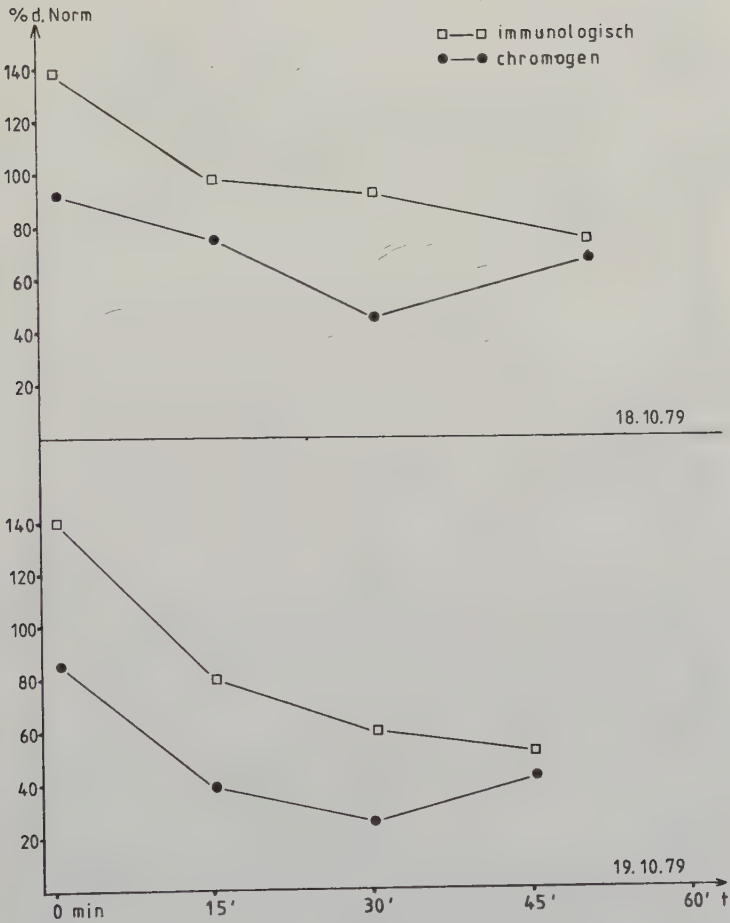
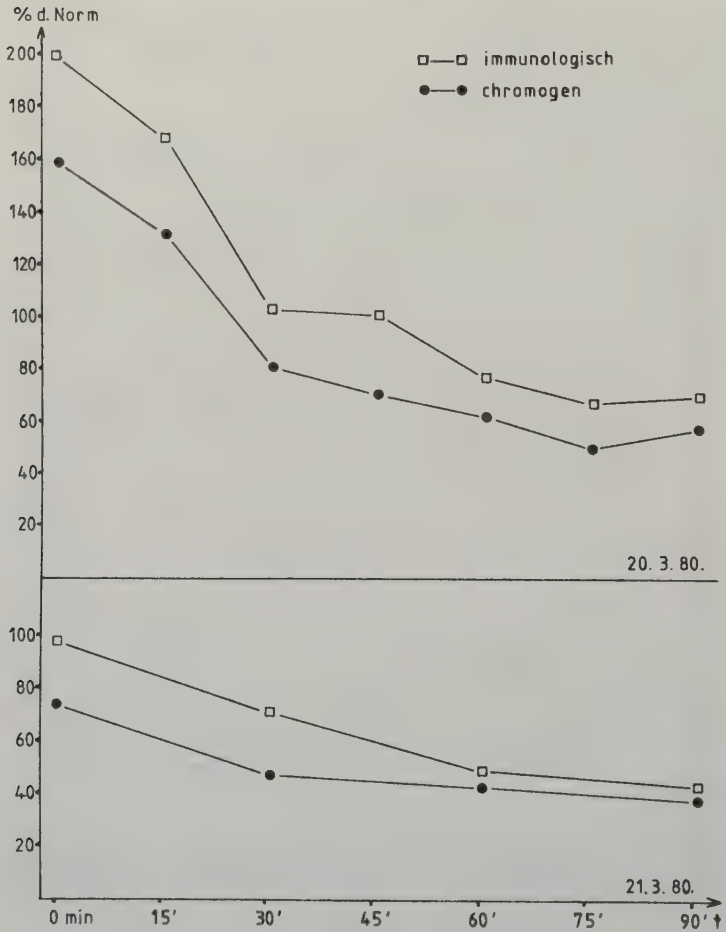


Abb. 8.3.

Cl-INA bei Hämostaseparation; Pat.: R.B.

Diagnose: Thyreotoxikose



9. Praekallikrein

Wie in früheren Ausführungen dargelegt wurde (Kap. 2.1.), bestehen zwischen dem Hämostase-, dem Complement- und dem Kallikrein-Kinin-System enge Beziehungen und Interaktionsmöglichkeiten. Vor allem der F XII scheint eine zentrale Verbindungsstelle der verschiedenen Systeme darzustellen. Um eine Vorstellung von Praekallikreinspiegeln und Aktivitäten von F XII bei Intensivpatienten zu bekommen, untersuchten wir ein großes Kollektiv unserer bereits angeführten Patienten auf diese zwei Parameter.

9.1. Bestimmungsmethode für Praekallikrein

Die Bestimmung des Praekallikreins erfolgt anhand chromogener Substrate entsprechend der Durchführung der Cl-Inaktivator-Bestimmung (siehe auch Kap. 4.1.). Da für Praekallikrein diese Bestimmungsart schon längere Zeit durchgeführt wird, sei sie hier nur kurz vorgestellt.

9.1.1. Materialien zur Praekallikreinbestimmung

Substrat: S-2302; Fa. Kabi; 1mMolare Lösung in dest. H_2O

Aktivator: Kaolin gelöst in Puffer; 10mg/ml; aufbewahrt bei 4°C;

Puffer: a: 3,03 g TRIS

1,70 g Imidazol

500 ml 0,1 n HCl

dest. H_2O ad 1000 ml

Puffer: b: 4,04 g TRIS
2,27 g Imidazol
1,95 g NaCl
dest. H₂O ad 1000 ml

c: 11,69 g NaCl in 1000 ml dest. H₂O gelöst

Lösung a und b werden gemischt, so daß ein pH von 7,9 resultiert. Diese Mischung wird mit einem gleichen Volumen von Lösung c versetzt. Damit ergibt sich eine Pufferlösung mit einer Ionenstärke von 0,15 M und einem pH von 7,9 (Vorschrift laut Firma Pentaparm).

Poolplasma: Plasmagemisch von mindestens 25 gesunden Personen, hergestellt aus Normalpersonen der Blutbank des Bayerischen Blutspendedienstes, 8000 München 2, Beethovenplatz.

Geräte: entsprechend der Cl-Inaktivator-Bestimmung siehe Kap. 4.2.3.

9.1.2. Vorgangsbeschreibung

In einem Wasserbad von 37°C werden

1,4 ml Puffer (fertiges Gemisch)
0,1 ml Plasmaprobe 1:2 verdünnt mit isot.
NaCl-Lösung
0,1 ml Kaolinsuspension

für die Dauer von 7 Minuten inkubiert. Dann wird dieses Gemisch

3 Minuten bei Zimmertemperatur zentrifugiert (4000 U/min);

davon werden 0,8 ml Zentrifugationsüberstand entnommen,

2 Minuten bei 37°C angewärmt

und schließlich

0,1 ml S-2302 zugegeben,
gemischt und die Extinktionsänderung bei
405 nm und 37°C gemessen

9.1.3. Erstellen einer Eichkurve

Zur Erstellung der Eichkurve wurde ein Normalpool von mindestens 25 Spenderplasmen gesunder Personen verwendet. Der in mehrere Röhrchen aufgeteilte Pool wurde bei -40°C tiefgefroren und nach dem Auftauen sofort verwendet.

Das Plasma wird mit isotoner NaCl-Lösung 1:2 verdünnt. Mit dieser Mischung wird durch entsprechendes Verdünnen eine Verdünnungsreihe hergestellt, die mindestens 5 Werte enthält.

Werte:

100% : 1:2 Verdünnung der Probe mit isot. NaCl-Lsg.

50% : 1:4 Verdünnung mit isot. NaCl-Lsg.

25% : 1:8 Verdünnung mit isot. NaCl-Lsg.

12,5% : 1:16 Verdünnung mit isot. NaCl-Lsg.

0% : isotonische NaCl-Lsg.

Form:

Aufgetragen auf Millimeterpapier ergibt sich eine steil beginnende, ab 50% flacher werdende Kurve. Sie schneidet die Abszisse bereits bei ca. 6-7%, so daß eine Bestimmung kleinerer Werte, zumindest in unseren Versuchsreihen, nicht möglich war.

Abb. 9.1.3. zeigt diese Eichkurve.

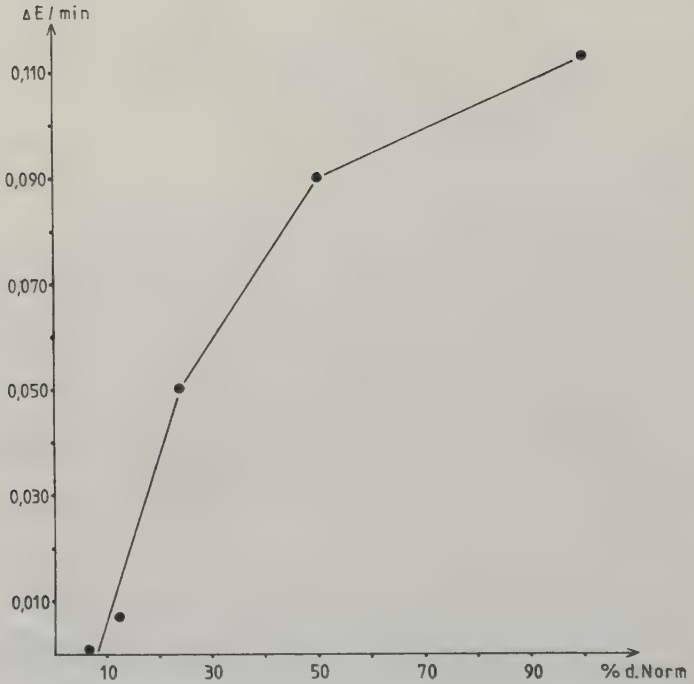


Abb. 9.1.3.

Praekallikrein - Standardkurve bestimmt mit S-2302 (Kaolin-aktivierung). Entgegen einer Literaturangabe (37), die eine lineare Beziehung zwischen $\Delta E/\text{min}$ und Praekallikrein-konzentration aufzeigt, (jedoch Aktivierung mit Cephatest^R) konnten wir keine lineare Beziehung darstellen.

Auch mit dem Substrat Chromozym PK + Kaolin wird in der Literatur (80) eine lineare Beziehung beschrieben.

9.2. Prinzip und Problematik der Praekallikreinbestimmung

Abb.9.2.1. zeigt das Prinzip, nach dem der chromogene Nachweis der Praekallikreinaktivität abläuft.

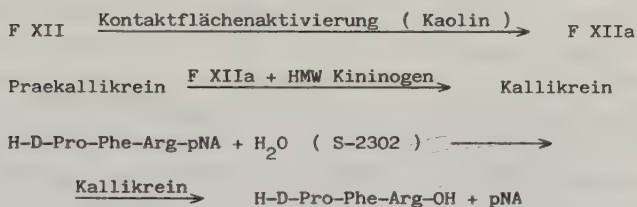


Abb. 9.2.1. (entsprechend 37)

Der hier dargestellte Funktionsablauf und damit der Nachweis des Praekallikreins, unterliegt jedoch einer größeren Zahl von Einflußfaktoren, die das Ergebnis bei Nichtbeachtung verfälschen können. Es bestehen Abhängigkeiten des Praekallikreinspiegels von:

- Konzentration und evt. Art der Aktivatoren (Kaolin, Dextran-sulfat etc.) (4,6,82)
- der Inkubationszeit (4)
- der Temperatur der Inkubation und Lagerung (4,44), mit der Möglichkeit der Kalt-Aktivierung bei Temp. zwischen 0°C und 4°C, der Lagerung nicht mind. unter -20°C (44), bzw. der Nichtaktivierung von Inhibitorproteinen bei Inkubation bei 0°C
- dem pH der Inkubationsprobe (4,5,12)
- dem Gehalt an C1-Inaktivator (4,44) über eine Hemmung des F XII

- Heparin in der Probe, durch Inaktivierung des Kallikreins (44)
z.B. durch Stimulation des C1-Inaktivators (55)
- F XII - Gehalt des Plasmas (20,37,44,80)
- HMW - Kininogen (44) - Gehalt des Plasmas

Vor allem eine Einflußgröße schien in diesem Zusammenhang interessant, nämlich die F XII - Konzentration. Da die Kontaktflächenaktivierung durch Kaolin über den F XII verläuft, ist anzunehmen, daß ein verminderter Spiegel an F XII eine erniedrigte Umwandlungsrate von Praekallikrein in Kallikrein zur Folge hat und somit das Ergebnis verfälscht wird. In der Literatur wird darauf hingewiesen, daß Konzentrationen an F XII von 25% (4,37,80) bzw. 50% (20) der Normalkonzentration notwendig sind, um den Praekallikreinnachweis nicht zu verfälschen.

In unserem Labor führten wir einen Versuch durch, mit dem wir diese "Mindestkonzentration" an F XII bestimmten.

Es wurden 9 Plasmaproben hergestellt, die verschiedene Konzentrationen an F XII enthielten. Um dies zu erreichen, wurde ein Normalplasma (F XII = 100%; Praekallikrein = 100%) mit einem bekannten F XII-Mangelplasma (F XII <1%; Praekallikrein = 100%) in definierten Volumenverhältnissen vermischt. Anschließend wurde die Praekallikreinbestimmung nach der oben genannten Vorschrift durchgeführt und gleichzeitig die wirkliche Konzentration des F XII anhand der Gerinnungszeit mitbestimmt.

Ergebnisse im einzelnen:

F XII-Konzentration	Präkall.-Konz.	Gerinn.zeit F XII
100%	100%	50,5s
80%	112%	51,0s
60%	104%	53,9s
40%	112%	57,0s
25%	104%	61,4s

F XII-Konzentration	Präkall.-Konz.	Gerinn.zeit F XII
20%	64%	64,3s
15%	40%	69,0s
10%	0%	74,0s
1%	0%	188,9s

Abb. 9.2.2. zeigt diese Ergebnisse graphisch aufgetragen.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, daß mit einer Beeinflussung des Praekallikreinnachweises gerechnet werden muß, wenn die F XII - Konzentration weniger als 25% (bezogen auf ein Normalplasma) beträgt.

Die geringe Zunahme des Praekallikreins von 100% auf 112% liegt innerhalb der Schwankungsbreite des Testsystems und ist wohl methodisch bedingt.

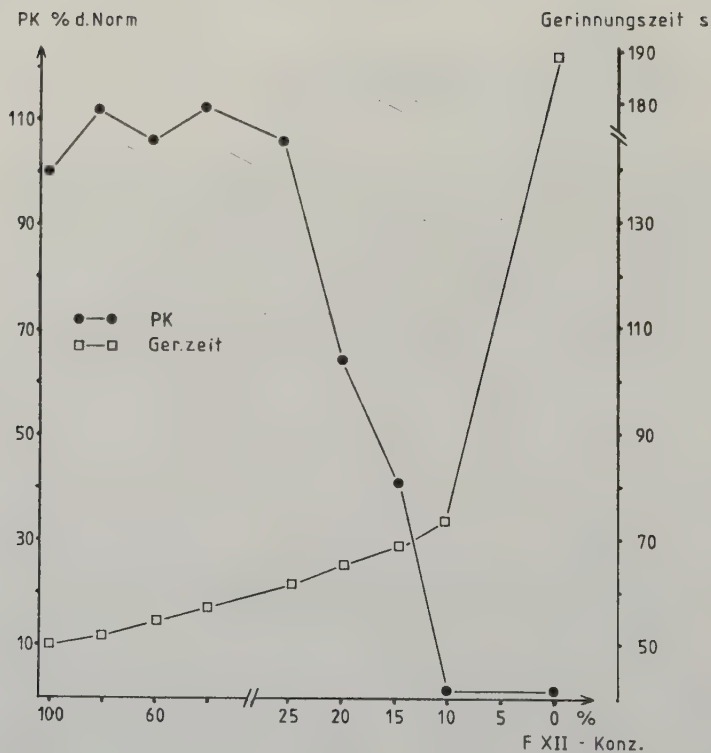


Abb. 9.2.2.

Darstellung der Abhängigkeit des Praekallikreinnachweises von der F XII - Konzentration. Die Zunahme der Gerinnungszeit zeigt die Abnahme der F XII - Konzentration graphisch.

9.3. Qualitätskontrolle

Auch zu dieser Testmethode wurde in unserem Labor eine inter-serielle Qualitätskontrolle durchgeführt.

Testbedingungen:

- Das Plasma von 3 Testpersonen wurde jeweils auf 15 Plastikröhrchen zu je 0,5 ml verteilt und bei -40°C tiefgefroren.
- Zu jeder Bestimmungsserie der folgenden Tage wurde je ein Plasma der Personen A, B und C mitbestimmt
- Es wurden insgesamt 41 Bestimmungen durchgeführt:
A = 14; B = 14; C = 13.
- Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.
- Plasma A und B waren unter 100%, Plasma C etwas über bzw. um die 100%, so daß bei der Serie C auch der Verdünnungsfehler mitberücksichtigt wurde.

Ergebnisse:

- Serie A:

- Mittelwert:	85 %
- Varianz:	19,35
- Standardabw.:	4,6 %
- Variationskoeff.:	5,4 %

- Serie B:

- Mittelwert:	81,5 %
- Varianz:	26,25
- Standardabw.:	5,3 %
- Variationskoeff.:	6,5 %

- Serie C:

- Mittelwert:	99,3 %
- Varianz:	36,5
- Standardabw.:	6,3 %
- Variationskoeff.:	6,3 %

Betrachtet man die Ergebnisse, so läßt sich feststellen, daß sie der Größe nach etwa den Resultaten der Cl-Inaktivator-Bestimmung entsprechen. Auch hier ging der Verdünnungsfehler mit einer Verschlechterung der Standardabweichung einher. In Bereichen unter 100% (Serie A,B) erweist sich das Testsystem mit einer Schwankungsbreite (2s-Bereich) von

$$x = \pm 10 \%$$

als wohl hinreichend genau.

Ergebnisse im einzelnen:

	Serie A %	B %	C %
1. Best: $\bar{x}$ =	85	$\bar{x}$ = 85	$\bar{x}$ = -
2.	78	74	96
3.	77	73	94
4.	85	77	96
5.	87	85	98
6.	90	90	108
7.	88	83	100
8.	83	81	98
9.	84	79	90
10.	92	89	95
11.	85	87	104
12.	81	79	100
13.	92	82	114
14.	84	77	98

9.4. Stabilität des Praekallikreingehaltes

Entsprechend den Einflüssen von Lagertemperaturen (44) sollte diese Testserie zeigen, ob mehrmaliges Einfrieren und Auftauen, bzw. unsere Lagerung bei -40°C , eine Abnahme des nachweisbaren Praekallikreins zur Folge haben.

Testbedingungen:

- 2 Plasmen wurden bei -40°C tiefgefroren;
 - Plasma 1 wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten insgesamt 10-mal eingefroren und wieder aufgetaut.
 - Plasma 2 wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen insgesamt 6-mal eingefroren und wieder aufgetaut.
- Der Praekallikreingehalt wurde entsprechend den Vorschriften bestimmt.

Ergebnisse im einzelnen:

	Plasma 1	%	Plasma 2
10.6.80 $\bar{x} =$	124		$\bar{x} = -$
12.6.80	110		-
19.6.80	116		-
10.9.80 (1)	134		72
10.9.80 (2)	132		61
15.9.80	130		58
16.9.80	120		63
17.9.80	128		69
11.9.80	126		63
18.9.80	134		

In keinem der beiden Testplasmen läßt sich eine signifikante Änderung des Praekallikreingehaltes durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen nachweisen.

9.5. Ergebnisse der Praekallikreinuntersuchung

9.5.1. Normalpersonen

Zur Abschätzung des Normalbereichs für Praekallikrein, untersuchten wir 30 Normalpersonen zwischen 20 - 40 Jahren. Die Ergebnisse zeigen eine enorme Streubreite für diesen Wert auf und schränken somit seine Aussagekraft ein.

Ergebnisse im einzelnen:

Patient	%	Patient	%	Patient	%
1	120	11	70	21	138
2	98	12	130	22	135
3	72	13	100	23	146
4	94	14	138	24	84
5	116	15	82	25	104
6	150	16	132	26	104
7	112	17	86	27	116
8	128	18	102	28	76
9	88	19	126	29	144
10	90	20	135	30	132

Daraus ergibt sich:

- Mittelwert:	112 %
- Varianz:	556
- Standardabw.:	24 %
- Variationskoeff.:	21,5 %
- Normalbereich (2s-Bereich)	64 - 160 %

9.5.2. Intensivpatienten

Bei 137 Patienten, die sich für kürzere oder längere Zeit auf unserer Intensivstation befanden, führten wir Untersuchungen zur Konzentration von Praekallikrein im Plasma durch. Das Ergebnis liefert ein Überraschendes Bild;

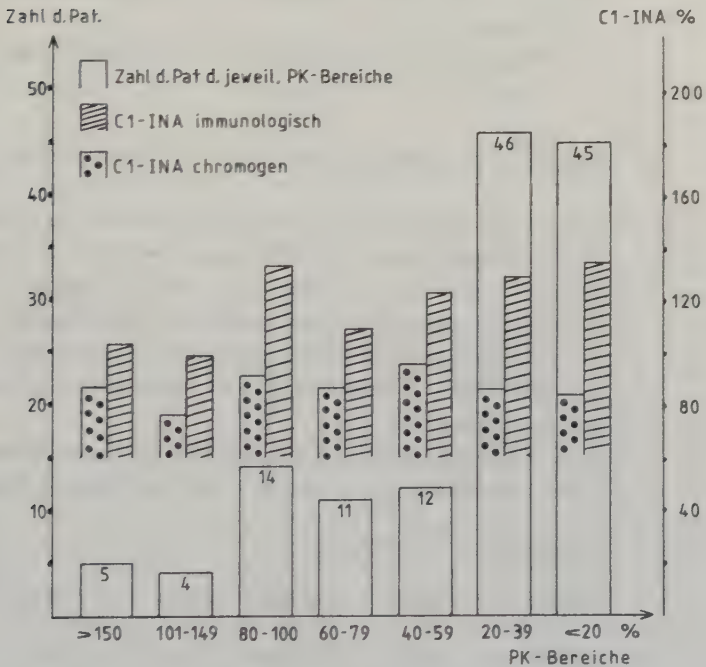


Abb. 9.5.2.

Darstellung der PK-Werte und der zugehörigen durchschnittlichen C1-INa-Werte bei 137 Intensivpatienten.

denn 75% der 137 Patienten (103 Pat.) zeigen Praekallikrein-konzentrationen in Bereichen unter 60%, d.h. im pathologischen Bereich. 25% zeigten Konzentrationen zwischen 60 % und über 200 %. Eine Zuordnung bestimmter Wertbereiche zu gewissen Krankheitsgruppen war nicht ersichtlich, so daß auf eine Darstellung dieser Beziehungen verzichtet wird.

Eine statistische Überprüfung des Zusammenhangs PK-C1-INA erbrachte kein positives Ergebnis, so daß eine Korrelation zwischen PK und C1-INA zumindest in diesem Kollektiv nicht ersichtlich ist.

Abb. 9.5.2. zeigt die Ergebnisse in einem Stabdiagramm.

9.6. Vergleich von Praekallikrein- und F XII-Konzentrationen

Aufgrund des Ergebnisses von 9.5.2. ergab sich die Überlegung, ob diesem hohen Anteil an erniedrigten Praekallikreinspiegeln nicht eine verminderte Konzentration an F XII zugrunde liegt. Zu dieser Fragestellung untersuchten wir 45 Patientenplasmen, die entsprechend ihrem PK-Gehalt in Gruppen eingeteilt wurden, auf ihre F XII - Konzentration. Alle 45 Plasmen entstammen dem Kollektiv aus 9.5.2.

Es wurden folgende Gruppen gebildet: PK - Konzentration $\geq 100\%$; 80 - 100%; 60 - 79%; 40 - 59%; 20 - 39%; $\leq 20\%$.

Ergebnisse im einzelnen:

Bereich	Patient	Praekallikr. %	F XII %
$\geq 100\%$	D.S.	110	63
	P.K.	300	100
	D.U.	240	100
	D.K.	102	75

Bereich	Patient	Praekallikr. %	F XII %
80 - 100%	W.I.	100	100
	B.E.	90	68
	R.J.	88	68
	O.	80	79
	T.R.	80	100
60 - 79%	S.F.	78	90
	K.F.	75	87
	K.H.	74	81
	L.H.	72	91
	K.R.	65	55
40 - 59%	W.A.	59	85
	H.1	50	86
	R.	43	37
	F.A.	40	68
20 - 39%	H.A.	33	63
	S.W.	30	81
	D.H.	27	68
	H.2	26	93
	F.H.	22	87
< 20%	A.G.	11	50
	T.L.	14	47
	D.U.	16	75
	M.A.	11	42
	O.R.	10	26
	S.A.	10	48
	G.J.	12	45
	G.	15	80
	G.R.	8	75

Bereich	Patient	Praekallikr. %	F XII %
≤ 20%	R.A.	19	39
	S.L.	13	79
	S.J.	19	54
	V.G.	12	78
	B.C.	9	81
	W.	17	67
	S.E.	20	59
	D.R.	18	71
	G.G.	8	15
	A.J.	9	6
	H.A.	17	20
	K.R.	17	7
	Z.R.	16	1

Die Ergebnisse und die Abb. 9.6. zeigen, daß bei einer Praekallikrein-konzentration von mehr als 20% der Norm, auch von einer F XII - Konzentration ausgegangen werden kann, die über jenen 25% der Norm liegt, die für eine unbeeinflusste Bestimmung von PK notwendig ist.

Eine direkte Beziehung der Nachweisbarkeit beider Faktoren scheint nicht zu bestehen (F XII >25%!), da während der fast linearen Abnahme des durchschnittlichen PK-Gehaltes sich die durchschnittlichen F XII - Konzentrationen erst bei einer PK - Konzentration von unter 20% d. Norm deutlich erniedrigten, ansonsten nahezu gleich blieben (siehe Abb. 9.6.).

Der Versuch macht aber auch deutlich, daß in einem bestimmten Prozentsatz von pathologischen Praekallikrein - Konzentrationen der mögliche Grund eine erniedrigte F XII - Konzentration sein kann (siehe auch 9.2.). Geht man davon aus, daß PK-Werte unter 60% d. Norm als pathologisch anzusehen sind, so haben von

den 31 Plasmen dieser Kategorie 5 Plasmen eine F XII - Konzentration unter 25%, das sind 16% der Plasmen. Diese 5 Plasmen waren aber nur in der Gruppe mit einer PK - Konzentration von unter 20% zu finden.

Man muß also davon ausgehen, daß in etwa 15 - 20% der Fälle von pathologisch erniedrigter PK - Konzentration unter 60% der Norm (möglicherweise erst bei Erniedrigungen von unter 20% der Norm), erniedrigte F XII - Konzentrationen unter 25% d. Norm zu finden sind, die den PK - Nachweis erheblich beeinflussen können (siehe auch Abb. 9.2.2.). Es ist in diesen Fällen notwendig, den F XII-Gehalt durch Zugabe von Normalplasma zu erhöhen, um somit den PK-Nachweis durchführen zu können.

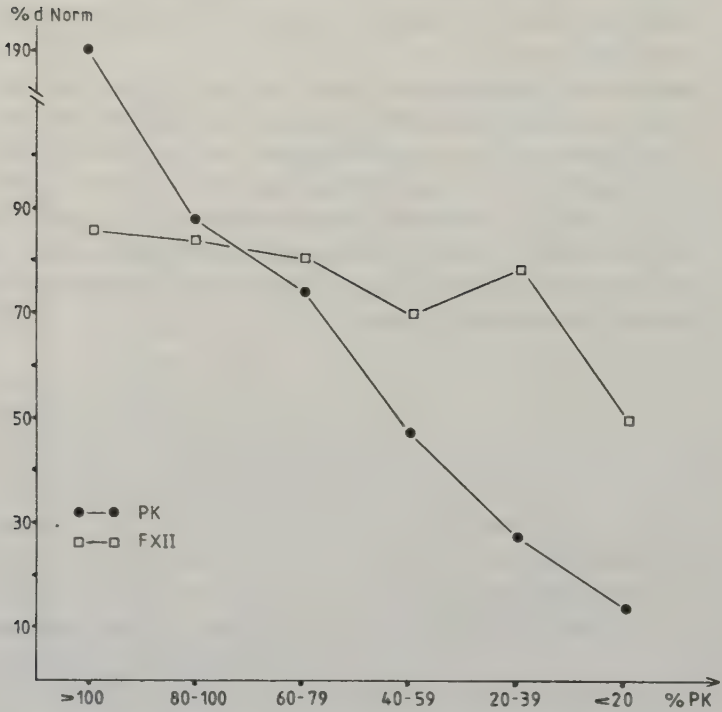


Abb. 9.6.

Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Praekallikrein-konzentrationen aufgetragen entsprechend der 6 festgelegten Bereiche. Die den einzelnen PK-Bereichen zugehörigen durchschnittlichen F XII - Konzentrationen sind ebenfalls als Kurve dargestellt (Erläuterung siehe Text).

10. Diskussion der Ergebnisse

10.1. Diskussion der neuen Methode

Bei der kritischen Betrachtung der neuen Nachweismethode für den C1-Inaktivator seien zunächst Überlegungen angeführt, die allgemein für den chromogenen Nachweis von Proteasen und Inhibitoren im Blutgerinnungssystem zutreffen. So ist nach den Möglichkeiten der standardisierten Herstellung des Substrates, dessen Spezifität für die nachzuweisende Substanz und dem Einfluß der Substratkonzentration auf das Ergebnis zu fragen. Svendsen (83) nennt hierzu einige unabdingbare Forderungen, die zu erfüllen sind, so z.B. die Tatsache, daß Spaltprodukte und Unreinheiten in der Substratpräparation keine Beeinflussung des Testablaufs mit sich bringen dürfen. Ødegard (57) weist darauf hin, daß im Rahmen einer Präparation oder längeren Lagerung, Enzyme ihre Aktivität, bzw. ihre Interaktionsfähigkeit gegenüber Inhibitoren verändern können. Solche Veränderungen wurden bei Thrombinpräparationen gefunden. Da auch der C1-INA Nachweis eine Enzympräparation der C1-Esterase verwendet, sind solche Veränderungen zu bedenken. Jedoch kommt auch Ødegard zu dem Schluß, daß bei Erstellung präziser Standardkurven die Verwendung chromogener Substrate, aufgrund besserer Ergebnisse, gegenüber natürlichen Substraten zu bevorzugen ist (57).

Vergleicht man den neuen C1-INA-Aktivitätsnachweis mit älteren Meßmethoden, so zeigt sich ein großer arbeitstechnischer Vorteil. Eine Aufnahme in das Routineprogramm scheint hierdurch möglich. Die Handhabung und Lagerung der Enzympräparation und des Substrates ist ohne Schwierigkeiten durchführbar, die Spezifität des S-2444 nach Austestung (4.2.1.1.) ausreichend. Die Möglichkeiten systematischer Fehler, z.B. durch unsachgemäßes Arbeiten, scheinen bei diesem Test nicht größer zu sein, als in vergleichbaren Nachweismethoden.

So zeigt auch die interserielle Qualitätskontrolle im Bereich unter

100 % der Norm an C1-INa-Aktivität mit einer zweifachen Standardabweichung von $\pm 8\%$ und einem Variationskoeffizienten von 4,5 % ein sehr gutes Ergebnis. Linearität der Standardkurve und hohe Stabilität des C1-INa lassen die Ergebnisse genau und gut reproduzierbar erscheinen.

Trotzdem sind Doppelbestimmungen angebracht.

Der Normalbereich wurde von uns von 77 % - 119 % festgelegt und entspricht somit Bereichen entsprechender Methoden. Erwähnenswert ist noch die Tatsache der einfachen Blutentnahme. Es handelt sich um Citratblut im Verhältnis 1 : 10.

Insgesamt gesehen, stellt der neue chromogene Nachweis des C1-INa wohl eine sinnvolle Erweiterung der bisherigen Aktivitätsmessungen dieses Inhibitors dar.

10.2. Diskussion der auftretenden Unterschiede zwischen chromogenem und immunologischem Nachweis

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß gerade bei Intensivpatienten es zu einer erheblichen Zunahme an immunologisch nachweisbarem C1-INa kommen kann, wobei die Aktivität im Normbereich erhöht oder erniedrigt ist.

Prinzipiell gibt es folgende Überlegungen für diese unterschiedlichen Ergebnisse:

- a) Bildung von Protease-Inhibitor-Komplexen,
wie z.B. mit Kallikrein (23). Dabei wird das C1-INa-Molekül inaktiv, bleibt jedoch immunologisch nachweisbar. Diese stöchiometrische Komplexbildung wies Harpel (31) für C1s und z.T. für Plasmin nach. Die Frage, warum es dann nicht zu einer schnelleren Elimination der Komplexe aus dem Körper kommt, wie dies für inaktive Komplexverbindungen üblich ist (72), sondern im Gegenteil die immunologische Konzentration ansteigt, bleibt damit jedoch unbeantwortet.

b) Proteolytische Spaltung am C1-INA-Molekül,

wie es etwa beim Antithrombin III und beim alpha-1-Antitrypsin, möglicherweise verursacht durch die Granulozytenelastase, bekannt ist (72).

Plasmin ist beispielsweise in der Lage, neben der stöchiometrischen Komplexbildung mit C1-INA, durch Proteolyse Spaltstücke des C1-INA zu produzieren, die zu einem Teil noch fähig sind, Komplexbildung mit dem C1s einzugehen, zum anderen Teil ihre Aktivität ganz verloren haben (31). Auch Trypsin erzeugt vom C1-INA inaktive Spaltprodukte (31). Die immunologische Nachweisbarkeit kann dabei erhalten bleiben. An einem Fall eines hereditären angioneurotischen Ödems zeigt Harpel (32), daß abnorme C1-INA-Varianten immunologisch identisch mit normalem C1-INA sein können. Möglicherweise können diese inaktiven Spaltprodukte, unabhängig davon, wie sie entstehen, längere Zeit im Kreislauf persistieren, bevor sie eliminiert werden.

Welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, oder ob beide Vorgänge zu selben Zeit ablaufen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht entschieden werden.

Auch für die Art und Weise, wie diese Differenz zwischen Aktivität und Konzentration zustande kommt, gibt es verschiedene Ansatzpunkte:

a) Akuter Verbrauch der C1-INA-Aktivität,

wie es bei akuten schweren Erkrankungen, plötzlichen Gerinnungsvorgängen im Rahmen einer DIC, oder z.B. bei der Thrombolyse-therapie der Fall ist. Dabei kommt es zu einem Abfall der Aktivität, während die Konzentration des C1-INA nahezu unverändert bleibt und meist weiter im Normalbereich liegt. Allmählich, oder auch innerhalb von Stunden, wie etwa bei der Thrombolyse-therapie (s. Kap. 7), gleicht sich der Aktivitätsspiegel wieder der immunologischen Konzentration an.

- b) Chronischer Verbrauch an C1-INa-Aktivität, wobei die Differenz durch eine erhebliche Zunahme der Konzentration an C1-INa entsteht, während die Aktivität noch normal, oder bereits etwas erhöht ist. Vor allem langandauernde, schwere Entzündungszustände zeigen dieses Verhalten (s. Kap. 6.2.).

Der Verbrauch des C1-INa kann dabei als direkte Hemmwirkung in einem isolierten System, z.B. dem Kallikrein-Kinin-System, stattfinden; es ist jedoch auch möglich, daß die Inhibition erst in weiteren Regelkreisen abläuft. So ist es denkbar, daß bei Aktivierung des Gerinnungssystems es über Interaktionen, z.B. mit dem Complementsystem (2,64,65,88), zu einem Verbrauch des C1-INa nicht in der Vorphasengerinnung, sondern als Inhibitor, z.B. der C1-Esterase, kommt.

Da sich Gerinnungsvorgänge und die Aktivierung des Kallikrein-Kinin- und Complementsystems durch Antigen-Antikörperkomplexe in den meisten Krankheitsbildern überschneiden, wird die Schwierigkeit, die ablaufenden Vorgänge zu analysieren, noch verstärkt. Zu bedenken bleibt weiterhin, daß die zunehmende Verwendung von FFP gerade in der Intensivmedizin die Interpretation klinischer Werte erschwert, da die Substitution von FFP die Plasmaspiegel nahezu aller Faktoren und Inhibitoren verändern kann.

10.3. Diskussion der C1-Inaktivator-Konzentrationen und Aktivitäten bei Intensivpatienten mit:

10.3.1. Lebererkrankungen und gastrointestinalen Blutungen (Kap. 6.1.)

In dieser Gruppe, in der wir insgesamt 36 Patientenplasmen untersuchten, fanden wir bei 17 Patienten mit Leberzirrhose - davon 13 mit GI - Blutung - in nahezu allen Fällen, bis auf einen Grenzwert von 78 %, eine Erniedrigung der C1-INa-Aktivität. Die immunologischen Konzentrationen lagen im Gegensatz dazu, bis auf 3 Fälle,

im Normbereich. Die ATIII - Plasmaaktivitäten waren, wie auch andere Autoren bei Leberzirrhose festgestellt haben (86), ebenfalls alle unter den Normalbereich gefallen. Bei 19 Patienten mit GI-Blutung ohne Anhalt auf eine Leberschädigung zeigten nur etwa 25 % der Fälle eine Aktivitätsverminderung an C1-INA. Die Konzentrationen waren überwiegend normal, bzw. erhöht, das ATIII nur in einem Fall unter 70 % erniedrigt, sonst im Normbereich. Potter (61) fand an einem umfangreichen Patientengut (n = 178) mit verschiedenen Erkrankungen der Leber- und Gallenwege normale bis erhöhte Werte an C1-INA. In keiner seiner Untersuchungsgruppen hatte er eine Verminderung an C1-INA festgestellt. Berücksichtigt man, daß er nur immunologische Methoden benutzte und somit nur Konzentrationen nachwies, so widerspricht sein Ergebnis nicht dem hier vorgelegten. Auch bei uns zeigte sich lediglich bei 3 von 36 Patienten eine Erniedrigung der Konzentration. Da die Leber den Syntheseort verschiedener Prokoagulationsfaktoren (43) und Inhibitoren, wahrscheinlich auch des C1-INA (17,25,36), darstellt, ist es nicht verwunderlich, daß es bei Funktionsstörungen der Leber zu Veränderungen in den genannten Systemen kommt.

Folgende pathophysiologische Ansatzpunkte (43) sind für diese Störungen, wie sie für das Complement- (45,62) und das Hämostasesystem (42,53,90) beschrieben werden, zu diskutieren:

- a) Verminderung der Synthese der genannten Faktoren;
konsekutiv kommt es zu einem Absinken der Plasmaaktivität und der Konzentration, z.B. auch der Inhibitoren, wie etwa dem ATIII (43) und wohl auch dem C1-INA, wie unsere Ergebnisse unter 6.1. vermuten lassen. So waren bei unseren Patienten mit Leberzirrhose die Konzentrationen niedriger als bei den Patienten ohne Leberschäden (s.6.1.). C1-INA-Aktivität und C1-INA-Konzentration zeigten in dieser Gruppe eine signifikante Korrelation ($r = 0,66$; $p < 0,001$, $n = 36$).

Dies ist als wichtiger Hinweis dafür anzusehen, daß die Leber tatsächlich den Syntheseort für den C1-INA darstellt. Die signifikante Korrelation des C1-INA mit dem ATIII ($r = 0,82$; $p < 0,001$; $n = 33$) wäre in dieser Richtung zu deuten, jedoch auch im Rahmen einer DIC zu interpretieren.

b) Abnahme der hepatischen Clearancekapazität des RES;

dies ist einerseits bedingt durch eine Einschränkung der Mikro- und Makrozirkulation (z.B. durch Mikrothrombosierungen als Folge der Hyperkoagulabilität im Bereich der intrahepatischen Gefäße, oder durch hämorrhagischen Schock bei portaler Hypertension mit Blutung), andererseits durch eine Überlastung der zellulären Phagozytoseleistung. Diese kommt v.a. durch Endotoxine, freigesetzte Thrombokinasen, z.T. aus untergehenden Hepatozyten, sowie durch aktivierte Gerinnungsendprodukte und Fibrinolyseaktivatoren zustande.

Die aus dieser Belastung resultierende verminderte Elimination der genannten Faktoren aus dem Kreislauf erzeugt eine Hyperkoagulabilität, die zusammen mit der Aktivierung der Fibrinolyse - der Plasminogenaktivator wird ebenfalls ungenügend eliminiert - auf dem Boden erniedrigter Syntheseleistung, v.a. von Inhibitoren wie unter a) beschrieben, zu therapeutisch schwer zu beeinflussenden Gerinnungsstörungen mit Verbrauch der Inhibitoren, ATIII, C1-INA, führen kann.

Diese Überlegungen scheinen v.a. für die thrombophile Gesamtsituation von Patienten mit schweren Leberschäden verantwortlich zu sein. Das gleichsinnige Absinken von ATIII- und C1-INA-Aktivität (s.6.1.) bei Leberzirrhose wäre dann auch im Sinne einer ablaufenden DIC interpretierbar. So fanden Klingemann et al. (43) erhöhte Fibrinogen-Spaltprodukte, wohl im Rahmen einer DIC mit sekundärer Hyperfibrinolyse, bei 6 von 8 Patienten mit blutenden Ösophagusvarizen aufgrund einer Leberzirrhose. Bei Patienten mit portaler Hypertension, die nicht auf dem Boden

einer Leberzirrhose entstanden war, zeigten sich überwiegend normale Gerinnungswerte. Mobarhan (53) wies bei 19 Patienten mit Leberzirrhose in nahezu 50 % der Fälle Zeichen einer DIC im Zustand der gastrointestinalen Blutung nach.

Im Rahmen der veränderten Synthesefunktion der Leber resultieren auch Veränderungen der Konzentrationen von Complementfaktoren (45,62), wobei es sich jedoch nicht ausschließlich um Synthesestörungen handeln muß, sondern die Leberschädigung auch Folge eines immunologischen Geschehens mit Verbrauch von Faktoren sein kann (45).

Zur Frage der Verminderung bestimmter Koagulationsfaktoren bei Leberschäden ist auch die Möglichkeit der Synthese defekter, inaktiver Moleküle zu diskutieren (90). Die Tatsache, daß sich die Blutungen an Umfang und nachfolgender Substitution nicht wesentlich voneinander unterscheiden, zeigt, daß ihr Einfluß auf die Cl-INA-Plasmaspiegel nur von untergeordneter Bedeutung ist. Auch in den Unterschieden zwischen Cl-INA-Aktivität und Konzentration waren keine wesentlichen Abweichungen zwischen den Gruppen mit und ohne Leberzirrhose festzustellen, was als Argument gegen eine DIC anzusehen wäre.

Bei den als Kasuistik dargestellten Fällen spielen wieder beide Probleme eine schwer abzuschätzende Rolle. Lediglich bei einem Pat. (M.S.) könnte die Tatsache, daß trotz umfangreicher Substitution zu Beginn keine befriedigende Cl-INA-Aktivitätserhöhung zustande kam und zweimal ein akuter Aktivitätsabfall eintrat, als Hinweis auf eine ablaufende DIC gewertet werden.

10.3.2. Sepsis, Infektionen und allg. Entzündungen

Unser Patientengut umfaßt 12 Fälle mit einem septischen Krankheitsbild. Lediglich bei einer Patientin fanden wir einen Abfall der C1-INA-Aktivität unter den Normbereich. Es war jedoch, wie bereits erwähnt, der einzige Fall, bei dem Plasmaproben bereits zu Beginn der Sepsis zur Verfügung standen. Alle C1-INA-Aktivitäten der anderen, bereits länger erkrankten Patienten, lagen im Normbereich, bzw. waren erhöht. Die immunologischen Konzentrationen waren vor allem bei den länger bestehenden Krankheitsbildern stark vermehrt, wobei auch die Differenz zur Aktivität erhöht war.

Das Auftreten einer disseminierten intravaskulären Gerinnung ist eines der wichtigen Probleme bei septischen Krankheitsbildern, wobei die laborchemische Diagnose der DIC bisweilen schwierig sein kann (16,28,78).

Witte (91) verdeutlicht an Patienten mit septischem Schock die eintretenden Veränderungen im Gerinnungssystem.

Er fand Erhöhungen der Fibrinospaltprodukte und Erniedrigungen der Inhibitoren ATIII und alpha-2-Macroglobulin. Eine Verminderung des C3 im Complementsystem, bei normalem C4, sprach für eine Aktivierung über den Nebenweg des C3. Dabei kann eine Aktivierung des Complementsystems, z.B. über diesen Nebenweg des C3 (93,67), eine Aktivierung des Hämostasesystems nach sich ziehen (93). Es sind jedoch auch direkte Einflüsse des septischen Geschehens auf das Gerinnungssystem möglich. So wird neben der Aktivierung des F XII durch Endotoxin (81) eine Freisetzung von Gewebethrombokinase-artiger Substanzen aus Monozyten (87), bzw. Granulozyten (81) diskutiert.

Neben einer toxischen Leberschädigung mit nachfolgender Synthesestörung, z.B. von Inhibitoren, ist die Hemmung der Phagozytosefunktion des RES und der Fibrinolyse möglich (10,54).

Schließlich spielen auch Schockzustände und Blutdruckabfall (18) beim Zustandekommen der DIC bei Sepsis eine wichtige Rolle. Letztendlich resultiert eine Aktivierung verschiedenster Regelkreise, z.B. des Kallikrein-Kinin-Systems (51), so daß ein Abfall der Aktivität in diesen Mechanismen, bzw. ihrer Inhibitoren, wie etwa des ATIII und des C1-INA, verständlich wird. Die Tatsache, daß wir den eigentlich zu erwartenden C1-INA-Abfall bei Sepsispatienten nicht vorgefunden haben, konfrontiert uns mit einem weiteren zu beachtenden Gesichtspunkt, dem Zeitfaktor!

Aufgrund unserer Ergebnisse scheint es von großer Bedeutung zu sein, zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes die Plasmaprobe entnommen wird. Das Synthesystem des C1-INA ist, wie es die Beispiele der Thrombolysetherapie (Kap. 7) gezeigt haben, in der Lage, innerhalb von Stunden einen akuten Aktivitätsabfall auszugleichen. Erfolgt die Blutentnahme erst in einem späteren Stadium des septischen Geschehens, so hat sich möglicherweise die Synthese des C1-INA auf das neue Gleichgewicht eingestellt und kompensiert den erhöhten Inhibitor-Verbrauch mit verstärkter Produktion, so daß die Aktivität wieder im Normbereich liegt. Ausdruck des erhöhten Umsatzes wäre dann das Ansteigen der immunologisch nachweisbaren Konzentrationen, wie wir es bei unseren Sepsispatienten überwiegend antreffen. Erfolgt die Blutabnahme im Anfangsstadium der Erkrankung, wie etwa bei einer Pat. (G.M., siehe 6.2.2.), ist der Aktivitätsabfall u.U. nachweisbar. In diesem Fall setzte der C1-INA-Aktivitätsverlust exakt mit Beginn der Fieberschübe, den positiven Blutkulturen und dem Abfall der Gerinnungswerte ein.

Der erhöhte Umsatz an C1-INA und die damit verbundene Zunahme der Konzentration und z.T. auch der Aktivitäten macht sich auch in einer signifikanten Korrelation zwischen C1-INA-Aktivität und C1-INA-Konzentration bemerkbar ($r = 0,82$; $p < 0,001$; $n = 12$).

Eine Verminderung der Eliminationsfähigkeit, z.B. des RES (10), begünstigen möglicherweise das Ansteigen der inaktiven C1-INA-Substrat-Komplexe, bzw. Spaltstücke, so daß die Elimination von der Produktion übertroffen würde.

Das Ausmaß der immunologischen C1-INA-, bzw. die Differenzserhöhung gegenüber der Aktivität, scheint somit Ausdruck für Dauer und Schwere eines septischen Zustandes, bzw. einer schweren entzündlichen Erkrankung zu sein.

Eine Synthesesteigerung anderer Gerinnungsfaktoren bei Sepsis ist beschrieben (87). Hohe immunologische C1-INA-Konzentrationen bei Sepsis fielen auch in einer anderen Untersuchung auf (74).

Bei 10 Fällen mit Pneumonie waren die immunologischen C1-INA-Werte ebenfalls überwiegend erhöht, mit einer zugehörigen Vergrößerung des Differenzbetrages gegenüber der Aktivität, die hauptsächlich im Normbereich, in 3 Fällen schwerster, ad exitum führender Pneumonie, unter dem Normbereich lag. Da sich in den sonstigen Gruppen kein Anhalt einer Beziehung zwischen Todesrate und C1-INA-Aktivität ergab, sei dies aufgrund der geringen Fallzahlen als mehr oder weniger zufällig angesehen.

Schramm et al. (74) fielen bei Patienten mit Pneumonie keine verwertbaren Veränderungen des C1-INA auf, wobei jedoch, wie in dieser Untersuchung, die Patienten überwiegend ihre Krankheit überlebten. Neben den Erscheinungen, wie sie bei den Bakteriämien beschrieben wurden, sind bei diesen "lokalen Infektionen" noch pathophysiologische Vorgänge zu beachten, wie etwa intraalveoläre Gerinnung bei Austritt eiweißreichen Exsudates (74) und Veränderungen der Mikrozirkulation am Ort der Infektion (68). Über eine Aktivierung des F XII und damit des Kininsystems, kommt es zu Veränderungen der Permeabilität im Bereich der Gefäße mit entsprechenden Auswirkungen auf die Hämostase.

Weiterhin können Immunglobuline zu Plättchenaggregation führen (34). Durch derartige Vorgänge ist ein zusätzlicher Verbrauch an C1-INA denkbar. Eine klinisch relevante Bedeutung des C1-INA-

Nachweises für diese Erkrankung läßt sich derzeit noch nicht erkennen.

Auch bei der Gruppe mit Allgemeininfektionen und Entzündungszuständen zeigt sich das Bild des chronischen C1-INA-Verbrauchs. 9 der 14 Patienten zeigten erhöhte Differenzen gegenüber der Aktivität, bei z.T. hoher immunologischer Konzentration. Die Aktivitäten waren in 3 Fällen erniedrigt, wobei es bei einem Patienten zu einem Fieberanstieg bis 40° C mit gerinnungsanalytischen Veränderungen gekommen war:

Thrombozyten von 80 000, Thrombinzeit von 14s, Fibrinogen von 560 und positivem Godaltest (3x) (siehe 6.4. Pat. J.H.). Im gleichen Zeitraum kam es zum Absinken der C1-INA-Aktivität von 87 % auf 66 % d. Norm. Wahrscheinlich Ausdruck eines akuten Verbrauchs an C1-INA im Sinne einer DIC.

4 Patienten mit akuter Pankreatitis zeigten das erwartete Bild. In 3 Fällen, in denen die Krankheit bereits längere Zeit andauerte, normale bis erhöhte C1-INA-Aktivität. Immunologisch dabei in 2 Fällen Werte von 200 % ! Im Gegensatz dazu ein Fall (Pat. J.E., Abb. 6.6.1.), bei dem Plasmaproben bereits am ersten Tag der Erkrankung zur Verfügung standen; Aktivität dabei maximal erniedrigt, mit allmählichem Anstieg in den Normbereich; Konzentration anfangs unterer Grenzwert mit ebenfalls nachfolgendem Anstieg über die Norm. Gerinnungsanalytisch waren in keinem der Fälle abnorme Werte festzustellen.

Eine ähnliche Beobachtung (14) beschreibt ebenfalls einen Abfall an C1-INA-Aktivität bei Pankreatitis. Die Erniedrigung begann bei Einsetzen der Symptomatik und dauerte etwa 2 Wochen an. Eine Erklärung für diesen Aktivitätsverlust fand Colman (14) jedoch nicht. Pathophysiologisch wäre möglicherweise an eine Enzymaktivierung, z.B. im Kallikrein-Kinin-System, bei akuter Pankreatitis zu denken, die zu Beginn einen Verbrauch an Inhibi-

torpotential, z.B. des C1-INA, verursacht. Zu einem Anstieg in den Normalbereich käme es dann wieder durch eine bereits beschriebene Synthesesteigerung, die eine Erhöhung der immunologisch nachweisbaren Konzentrationen - wie in unserer Gruppe ersichtlich - mit sich brächte.

Ob der Unterschied in der C1-INA-Aktivität, bzw. Konzentration (Kap. 6.7.), eines Falles mit Malaria tertiana und falciparum mit stark erniedrigter Aktivität und in dem unteren Normbereich liegender Konzentration gegenüber erhöhten Konzentrationen und normaler bis erhöhter Aktivität bei 2 Fällen einer Malaria tropica, bedingt ist durch die Malariaart, sei als Möglichkeit angeführt, als Einzelbeobachtung jedoch nicht bewertbar. Wesentliche ursächliche Unterschiede im Abnahmezeitpunkt, bzw. im gerinnungsanalytischen Bild, waren nicht festzustellen. Über das Auftreten von Verbrauchskoagulopathien bei Typhus wird in der Literatur mehrfach berichtet (3,76). Unter Laborbedingungen konnte Colman (13) an freiwilligen Versuchspersonen, die 10^5 Erreger der Gattung Salmonella typhi zu sich nahmen, einen signifikanten Abfall der Praekallikreinaktivität und zugleich der Inhibitoraktivität (C1-INA) im Plasma feststellen. Die immunologische Nachweisbarkeit änderte sich dabei nicht wesentlich. Eine neu auftretende Bande in der Elektrophorese mit entsprechendem Molekulargewicht zeigte das Auftreten von Komplexmolekülen zwischen Kallikrein und C1-INA an, die funktionell inaktiv waren. Auch eine Überkompensation der C1-INA-Aktivität nach dem Abfall ließ sich darstellen. Dieser Versuch zeigt die Aktivierung des Plasma-Kininsystems und damit der Vorphasengerinnung mit konsekutivem Verbrauch an C1-INA. Das Auftreten von Verbrauchskoagulopathien bei Typhus wird somit verständlich.

Die Plasmaproben unserer Patienten erreichten uns erst wieder

im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf und somit in einem Stadium der " Überkompensation ", wie die bereits über Normalwert ansteigenden Aktivitäten und stark erhöhten Konzentrationen vermuten lassen. Wie in Kap. 7 bei Thrombolysetherapie dargestellt, kann sich ein C1-INA-Aktivitätsabfall innerhalb von Stunden normalisieren. Frühere Plasmaentnahmen hätten den C1-INA-Aktivitätsverlust möglicherweise aufgedeckt.

Neben all diesen Überlegungen über einen Verbrauch des C1-INA im System der Vorphasengerinnung, darf man nicht ganz vergessen, daß der C1-INA u.a. auch Inhibitor der C1-Esterase ist und somit ein Aktivitätsverbrauch auch im Complementsystem möglich ist, ohne Aktivierung des Gerinnungssystems.

10.3.3. Lungenembolien

Der Zeitpunkt des Embolieereignisses, der nicht immer exakt festzustellen war, und die auftretenden Grunderkrankungen und deren mögliche Beeinflussung der C1-INA-Aktivität, erschweren die Interpretation der Ergebnisse dieser Krankheitsgruppe. So konnten wir bei 2 Patienten (siehe 6.5.), bei denen Plasma-proben eindeutig kurz nach dem Zeitpunkt der Embolie zur Verfügung standen, Aktivitätsveränderungen des C1-INA, im Sinne eines Aktivitätsverlustes, nachweisen. Dieser C1-INA-Abfall war in beiden Fällen von Veränderungen der gerinnungsanalytischen Parameter (siehe 6.5.1.) begleitet.

Alle anderen Ergebnisse dieser Gruppe sind, wie bereits erwähnt, nur bedingt im Zusammenhang mit der Lungenembolie zu interpretieren (siehe 6.5.).

Schramm et al. (74) konnten ebenfalls keine signifikanten C1-INA-Veränderungen bei Lungenembolien feststellen, wobei jedoch die geringen Fallzahlen (n=8), wie auch in unserer Gruppe, für eine endgültige Bewertung nicht ausreichen.

10.3.4. Malignomerkrankungen

Über die C1-INA-Plasmaspiegel bei diesem Krankheitsbild liegen bereits mehrere, z.T. widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vor (8,9,46).

Bach-Mortensen beschrieb 1975 (9) in einem größeren Patientengut signifikante Erhöhungen an C1-INA bei bösartigen Erkrankungen. Werden Virusinfektionen ausgeschlossen, die ebenfalls eine C1-INA-Erhöhung verursachen können, so ist diese Erhöhung möglicherweise als Indiz für eine Malignomerkrankung anzusehen (9). Ebenso könnten die C1-INA-Konzentrationen ein Maß für die Aktivität der Erkrankung darstellen (9). Lachmann (46) widerspricht dieser These sehr entschieden. Zwar bezweifelt er nicht das Vorkommen von C1-INA-Erhöhungen bei Malignomen, doch hatte er in einer eigenen Untersuchung an verschiedenen Krankheitsbildern ebenfalls Erhöhungen festgestellt, die sich von der Malignomgruppe nicht unterschieden, so daß vermehrter C1-INA kein diagnostisches Mittel für Malignomerkrankungen darstellt (46). Während Bach-Mortensen Konzentrationen bestimmt hatte, wies Lachmann Aktivitäten nach. Diesen Umstand machte Astrup (8) z.T. für diesen Widerspruch verantwortlich. Er selbst fand 1977 (8), in einer Studie, C1-INA-Erhöhungen vor allem bei metastasierenden Malignomen. Ebenso bei Erkrankungen mit erhöhter Zelldestruktivität, z.B. Infektionen, Lungenembolien und Lebererkrankungen. Der mögliche Grund für C1-INA-Erhöhungen bei Malignomen könnte die Tatsache darstellen, daß Krebszellen C1-INA produzieren können. Osther (59) hat C1-INA auf der Oberfläche von Malignomzellen und die Produktion des C1-INA durch Krebszellen nachgewiesen. Sie dienen möglicherweise dem Schutz gegen die Zellzerstörung durch aktiviertes Complementsystem und entsprechen dem normalen, biologischen C1-INA (59).

Leider waren in unserem Patientengut nur drei Fälle eindeutig dieser Erkrankung zuzuordnen, so daß unsere Ergebnisse nur

Anhaltspunkte darstellen können.

Wie bei vielen anderen Erkrankungen, so wurde auch bei Malignomen das Auftreten von chronischer DIC beobachtet (63,69). Es könnte also durchaus sein, daß neben den beschriebenen Veränderungen auch Gerinnungsvorgänge und der damit verbundene Verbrauch an C1-INA eine Rolle spielen. Zeichen einer DIC waren auch bei unseren Patienten vorhanden: Thrombozytopenie, positiver Godaltest, Quickwert unter der Norm. Die Ergebnisse für den C1-INA würden sich dabei in die bisherigen Ergebnisse einreihen lassen (siehe 6.9.). Vor allem bei einem Pat. (F.J.) ergibt sich mit einer Aktivität von 58 % und einer Konzentration von 174 % eine Differenz von 116 %, möglicherweise als Zeichen eines chronischen C1-INA-Verbrauchs.

Es spielen bei diesem Krankheitsbild jedoch mehrere Faktoren eine Rolle. Vor allem wäre es interessant, ob diese, von Malignomzellen produzierten C1-Inhibitoren (59), in der Lage sind, chromogene Substrate zu spalten wie der physiologische C1-INA. Sollten hier Unterschiede bestehen, wäre es möglich, hohe immunologische Konzentrationen als inaktive C1-INA-Substratkomplexe, oder als proteolytisch abnorm reagierende " Malignom-C1-Inaktivatoren " zu charakterisieren.

Als spezifisches Indiz für eine Malignomerkrankung eignet sich der Nachweis des C1-INA nach den Ergebnissen dieser Arbeit, entsprechend der Meinung von Lachmann (46), nicht.

10.4. Diskussion der Ergebnisse zur Bestimmung der Praekallikreinaktivität

10.4.1. Diskussion der Methode

Da der Nachweis des Praekallikreins ebenfalls auf der Abspaltung des para-Nitroanilins aus einem chromogenen Substrat beruht, sei auch auf allgemeine Überlegungen zu Substraten unter 10.1. verwiesen. Im Gegensatz zum C1-INA-Test wird jedoch hier eine bereits im Plasma befindliche Vorstufe, das Praekallikrein, zu Kallikrein aktiviert, das die Abspaltung des para-Nitroanilins bewerkstelligt. Dieser Ablauf unterliegt, wie unter 9.2. erörtert, einer Vielzahl von Störmöglichkeiten. Vor allem scheint eine Abhängigkeit von den verschiedenen Aktivatorsubstanzen, z.B. Kaolin oder Dextransulfat und einer für die Aktivierung notwendigen Mindestkonzentration an F XII und HMW-Kininogen, im Plasma zu bestehen (44).

So lassen einzelne Untersuchungen auf eine Proportionalität zwischen F XII und Praekallikreinnachweis schließen (15), so daß auch höhere Konzentrationen an F XII, als die geforderten 25 %, eine Beeinflussung des Ergebnisses nicht ausschließen. Leider gelang es uns nicht, die in der Literatur angeführte lineare Beziehung zwischen dem Extinktionsunterschied pro Zeiteinheit und dem Praekallikrein Gehalt zu erzielen (37,80). Der Unterschied in den Aktivatoren, bzw. den chromogenen Substraten, mag hier eine Rolle spielen.

Die interserielle Qualitätskontrolle zeigt mit einer 2s-Abweichung von ± 10 % und einem Variationskoeffizienten von 6 % im Bereich unter 100 % der Norm ein gutes Ergebnis. Auch die Stabilität des Praekallikreins unter unseren Laborbedingungen scheint ausreichend zu sein, um systematische Fehler, z.B. durch Lagerung, zu vermeiden (siehe 9.4.).

10.4.2. Diskussion der Ergebnisse bei Normalpersonen und Intensivpatienten

Das Kallikrein-Kinin-System des Menschen greift, wie Abb. 2.1.1. zeigt, über den F XII in die Vorphasengerinnung ein. Dabei kommt es in einer kreislaufartigen Reaktion zu einer gegenseitigen Aktivierung von F XII-Praekallikrein-Kallikrein-F XII (39,52). Das Praekallikrein liegt als inaktive Vorstufe, möglicherweise als Komplex mit HMW-Kininogen (19,52), im Plasma vor. Ein Fehlen des Praekallikreins (Fletcher-Faktors) zeigt sich gerinnungsanalytisch in einer stark verlängerten PTT, bei fehlender Blutungsneigung. Im Verlauf von Entzündungsprozessen kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems.

Die dabei entstehenden Kinine erzeugen u.a. (41) Vasodilatation, Veränderungen der Gefäßpermeabilität, die möglicherweise durch C1-INA vermindert wird (38), Schmerz und Hypotonie. Dem Kallikrein werden Chemotaxis von Granulozyten (40) und Monozyten (22) zugesprochen. Die Beteiligung der Kinine in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen des Körpers, ursächlich, oder als Folge, erschwert die Interpretation einzelner Praekallikreinspiegel. Bereits bei unseren Normalpersonen zeigten sich erhebliche individuelle Unterschiede. So ergab sich ein Normalbereich von 64 - 160 %! Auch bei Hunden wurden starke Schwankungen an Praekallikrein-Normalwerten beobachtet (1). Als pathologisch wurden von uns Werte unter 60 % der Norm angenommen.

Über Veränderungen des Praekallikreins bei Erkrankungen liegen einige Berichte vor. So zeigt sich in einem künstlich erzeugten Endotoxin-Schock bei Hunden (1) nach einem Anstieg des Praekallikreins ein Abfall gegen Ende des tödlichen Schocks auf etwa 37 % des Ausgangswertes. Auch beim Menschen ist in gramnegativen

Bakteriämien (51) und Endotoxinschock (14) ein Praekallikreinabfall beobachtet worden. Bei Leberzirrhose ist eine Praekallikreinniedrigung beschrieben (14,92), was für die Synthese in der Leber spricht. Da es sich bei unserem Krankengut ausnahmslos um schwerstkranke Patienten handelt, die einer Vielzahl von Manipulationen - Punktionen, Katheter, Beatmung etc. - ausgesetzt waren und meistens auch Entzündungszeichen irgendwelcher Art aufwiesen, ist es nicht verwunderlich, einen derart hohen Anteil von 75 % erniedrigter Praekallikreinwerte zu finden. Die dabei sehr häufig erhöhten Differenzen zwischen C1-INA-Aktivität und immunologischer Konzentration lassen auch an abgelaufene Komplexbildungen zwischen C1-INA und Kallikrein im Sinne einer Vorphasenaktivierung der Gerinnung denken. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Praekallikrein und C1-Inaktivator ließ sich jedoch in unserem Kollektiv nicht erstellen. Als einzige Gruppe, bei der mehr als die Hälfte der Patienten normale Aktivitätsspiegel ($\geq 60\%$ der Norm) an Praekallikrein aufwiesen, waren Patienten mit Herzerkrankungen, bei denen auch die C1-INA-Werte und Differenzen der Konzentration zur Aktivität im Normbereich lagen. Gerade die Tatsache, daß der C1-INA einer der Hauptinhibitoren des Praekallikreins ist, sollte diese Möglichkeit der Komplexbildung sehr wahrscheinlich machen. Daß es in weitaus mehr Fällen zu einer Erniedrigung des Praekallikreins kommt, als es der C1-INA-Verbrauch vermuten ließe, zeigt, daß das Praekallikrein, aufgrund der Interaktionen des Kallikrein-Kinin-Systems in verschiedenen Regelkreisen des Körpers und aufgrund der Beeinflußbarkeit des Testes, kein idealer Parameter für eine abgelaufene Vorphasenaktivierung des Gerinnungssystems und damit einer drohenden DIC ist. Möglicherweise ist die Bestimmung des C1-Inaktivators hier von wesentlich besserer Aussagekraft. Diese Annahme zu belegen, bedarf es jedoch erst weiterer Untersuchungen mit der neuen Methode.

11. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wird über eine neue Nachweismethode für den Cl-Esterase Inaktivator (Cl-INA) berichtet. Die Hemmung der Cl-Esterase induzierten Abspaltung von gelbem para-Nitroanilin von einem synthetischen Substratmolekül (S-2444) läßt die Bestimmung der Aktivität des Cl-INA mit einem Spektralphotometer zu. Der Cl-INA stellt ein Inhibitormolekül dar, das seine Wirkung in verschiedenen Systemen, v.a. der Vorphasengerinnung, ausübt.

Der Test wird hier vorgestellt und auf seine Anwendbarkeit in einem hämostaseologischen Labor überprüft. Durch Erstellen von Eichkurven, Qualitätskontrollen und Stabilitätsproben erfolgt die Abgrenzung seiner Aussagefähigkeit. Die Gegenüberstellung mit bereits bekannten Nachweismethoden verdeutlicht den arbeitstechnischen Vorteil der neuen Methode, der eine Aufnahme in das Routineprogramm ermöglicht.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Aktivitätsmessung mit den Ergebnissen des immunologischen Konzentrationsnachweises macht deutlich, daß hier wesentliche Unterschiede im Plasmagehalt an Cl-INA vorhanden sind. Im weiteren Verlauf wird versucht, die Cl-INA-Aktivitäten und Konzentrationen und ihre Unterschiede bei verschiedenen Erkrankungen zu interpretieren.

An 50 gesunden Personen werden Normalbereiche für beide Methoden erarbeitet, ebenso " normale Differenzen " abgegrenzt. Für die chromogene Aktivitätsbestimmung ergibt sich dabei ein Normbereich von 77 % - 119 %. An einer größeren Zahl von Intensivpatienten werden die nachgewiesenen Cl-INA-Aktivitäten den Konzentrationen des Cl-Inaktivators gegenübergestellt. Eine Anordnung der Patienten nach bestimmten Krankheitsgruppen versucht, krankheitsspezifische Cl-INA-Spiegel aufzuzeigen. Die Darstellung eindrucksvoller Krankheitsfälle erfolgt als Kasuistik.

In unserem Patientengut wurden folgende Krankheitsgruppen untersucht:

- Lebererkrankungen und
gastrointestinale Blutungen (n = 36)
- Sepsis (n = 12)
- Pneumonie (n = 10)
- Allgemeininfekte (n = 14)
- Lungenembolie (n = 9)
- Pankreatitis (n = 4)
- Malaria (n = 3)
- Typhus abdominalis (n = 2)
- Malignomerkrankungen (n = 3)
- Herzerkrankungen (n = 14)

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß unter bestimmten Umständen Beziehungen zwischen Veränderungen der C1-INA-Plasmaspiegel und auftretenden Gerinnungsstörungen im Sinne einer DIC, akuter oder chronischer Art, darstellbar sind. Dabei kommt der Synthesefunktion der Leber für den C1-INA eine entscheidende Bedeutung zu. Dies wird bei Patienten mit Leberzirrhose, die ausschließlich erniedrigte C1-INA-Aktivitäten aufweisen, deutlich. Eine weitere, sehr wichtige Rolle spielt der Entnahmezeitpunkt der Blutprobe, in Bezug auf die Krankheitsdauer. Abnahmen in weitfortgeschrittenem Krankheitszustand erbringen zumeist erhöhte Aktivitäten und Konzentrationen, da die starke Synthesekapazität der Leber anfängliche Aktivitätsverluste sehr schnell auszugleichen vermag. Diese Erhöhungen, v.a. der Konzentrationen an C1-INA, stellen sich überwiegend bei chronischen, insbesondere entzündlichen Erkrankungen, ein. Eine Tatsache, die prognostische Wertigkeit erlangen könnte.

An 3 Fällen systemischer Thrombolyse und 7 Fällen von Hämo-
separation wird der Aktivitäts- und Konzentrationsverlauf an
Cl-INA dargestellt, wobei die Thrombolysetherapie einen akuten
Inhibitorverbrauch sozusagen in einem " in vivo " Versuch
widerspiegelt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird eine zweite chromogene
Aktivitätsmessung, der Nachweis von Praekallikrein im Plasma,
beschrieben. Wiederum erfolgt anhand von Eichkurven, Qualitäts-
und Stabilitätskontrollen und einem Normalkollektiv eine Ab-
grenzung der Aussagefähigkeit. Die starke Beeinflußbarkeit des
Testsystems schränkt die Beurteilbarkeit der Ergebnisse ent-
sprechend ein. Die Problematik spiegelt sich auch in einer
großen Streubreite an Normalwerten von 64 % - 160 % wider.
Starke Wechselwirkungen bestehen zwischen dem Praekallikrein
und dem F XII, der eine Mindestkonzentration von 25 % der Norm
aufweisen muß, um den Testablauf nicht zu stören.

Durchgeführte Untersuchungen legen diese Beeinflussung des PK-
Nachweises durch die Plasmaaktivität an F XII dar, lassen sie
jedoch in gewissem Rahmen abschätzbar, bzw. einschränkbar er-
scheinen.

137 Intensivpatienten werden auf ihren Praekallikreingehalt,
45 davon zusätzlich auf ihre Aktivität an F XII, untersucht.
Dabei weisen 3/4 der untersuchten Intensivpatienten erniedrigte
Aktivitäten an Praekallikrein auf, wofür jedoch bei einem Teil
der Patienten erniedrigte F XII - Plasmaspiegel verantwortlich
sind.

Insgesamt gesehen, so wird in der Diskussion verdeutlicht, stellt
der neue Test eine sinnvolle Erweiterung des Cl-INA-Nachweises
dar. Die Ergebnisse der Arbeit lassen erkennen, daß die Aktivität

des Inhibitors von mehreren Faktoren abhängt, so z.B. der Leberfunktion, Entzündungsprozessen und akuten Gerinnungsvorgängen, so daß eine Bewertung des Einzelfalls schwierig sein kann. Vor allem im Vergleich mit der immunologischen Konzentrationsmessung ergeben sich Aussagemöglichkeiten über akute und chronische Verbrauchszustände an C1-INA, die eventuell einen diagnostischen Ansatzpunkt für Dauer, Schwere und Prognose einer Erkrankung bieten.

Im Gegensatz dazu ist der chromogene Nachweis des Praekallikreins, aufgrund der Beeinflußbarkeit des Testablaufes und der Verstrickung des Kallikrein-Kinin-Systems in die verschiedensten Regelkreise, zumindest nach den Ergebnissen dieser Arbeit, nicht geeignet, abgelaufene Veränderungen in der Vorphasengerinnung, im Sinne einer DIC, in diagnostisch verwertbarer Form darzulegen.

Es sei nun weiteren nachfolgenden Untersuchungen überlassen, die Anregungen dieser Arbeit aufzunehmen und die klinische Anwendbarkeit, v.a. in der DIC-Diagnostik, des C1-INA-Nachweises in den einzelnen Krankheitsgruppen weiter zu belegen.

12. Literatur

1. Aasen, A.O.; Frølich, W.; Saugstad, O.D.; Amundsen, E.;
Plasma Kallikrein Activity and Prekallikrein Levels during
Endotoxin Shock in Dogs
Eur. surg. Res. 10: 50-62 (1978)
2. Agnello, V.;
Complement Deficiency States
Medicine Vol. 57, No. 1 1-23
3. Allen, N.; Nomanbhoy, Y.; Green, D.; Dunea, G.;
Typhoid fever with consumptive coagulopathy
J.A.M.A. 208,689 (1969)
4. Amundsen, E.; Gallimore, M.J.; Aasen, A.O.; Larsbraaten, M.;
Lyngaas, K.;
Activation of Human Plasma Prekallikrein: Influence of Activa-
tors, Activation Time and Temperatur and Inhibitors
Thrombosis Research 13; 625-636 (1978)
5. Amundsen, E.; Svendsen, L.;
A New Assay for Plasma Kallikrein Activity Utilizing a
Synthetic Chromogenic Substrate
In: New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromo-
genic Substrates. I. Witt; Vlg. de Gruyter 1977
6. Amundsen, E.; Svendsen, L.; Vennerød, A.M.; Laake, K.;
Determination of plasma kallikrein with a new chromogenic
tripeptide derivative
In: Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in
Health and Disease. DHEW publication No. (NIH) 76-791,
Washington, Dc, USA. pp 215-220, 1976
7. Arlaud, G.; Reboul, A.; Sim, R.; Colomb, M.G.;
Interaction of C1-Inhibitor with the C1r and C1s subcomponents
in human C1
Biochimica et Biophysica Acta, 576 (1979) 151-162

8. Astrup, J.; Colstrup, H.; Frandsen, B.;
Complement C1-Inactivator in the serum of patients with
malignant disease
Acta Radiologica Therapy Physics Biology 16 (1977) 5 Oct.
9. Bach-Mortensen, N.; Osther, K.; Strøyer, I.;
C1-Esterase Inactivators and C4 in Malignant Diseases
The Lancet, September 1975 S. 499
10. Benacerraf, B.; Sebestyen, M.A.;
Effect of bacterial endotoxins on the reticuloendothelial
system
Fed. Proc. 16, 860 (1957)
11. Bussard, A.;
Description d'une technique combinant simultanément
l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel:
l'électrosynérèse
Biochim. Biophys. Acta 34, 258 (1959)
12. Cleason, G.; Aurell, L.; Karlsson, G et alii;
Design of chromogenic peptide substrates
In: Chromogenic Peptide Substrates; hrsg. von M.F. Scully and
V.V. Kakkar; Vlg: Churchill Livingstone 1979, S. 20-31
13. Colman, R.W.; Edelmann, R.; Scott, C.F.; Gilman, R.H.;
Plasma Kallikrein Activation and Inhibition during Typhoid
Fever
The Journal of Clinical Investigation, Vol. 61 February 1978
287-296
14. Colman, R.W.; Mason, J.W.; Sherry, S.;
The Kallikreinogen-Kallikrein Enzyme System of Human Plasma
Ann. Int. Med. Vol. 71, 763 (1969)
15. Colman, R.W.; Mattler, L.; Sherry, S.;
Studies on the Prekallikrein (Kallikreinogen) - Kallikrein
Enzym System of Human Plasma
II. Evidence relating the Kaolin-activated arginine esterase
to plasma kallikrein
J. Clin. Invest. 48, 23, (1969)

16. Colman, R.W.; Robboy, S.J.; Minna, J.D.;
Disseminated Intravascular Coagulation; A Reappraisal
Ann. Rev. Med. 1979, 30, 359-374
17. Colten, H.R.;
Ontogeny of the Human Complement System: In vitro Bio-
synthesis of Individual Complement Components by Fetal Tissues
The Journal of Clin. Invest., Vol. 51, 725-730 (1972)
18. Corrigan, J.J.; Ray, W.L.; May, N.;
Changes in the Blood Coagulation System associated with
Septicemia
New. Engl. J. Med. 279, 851-856 (1968)
19. Donaldson, V.; Kleniewski, J.; Saito, H.; Sayed, J.K.;
Prekallikrein Deficiency in a Kindred with Kininogen
Deficiency and Fitzgerald Trait Clotting Defect
The Journal of Clinical Investigation, Volume 60
September 1977, 571-583
20. Egberg, N.; Bergström, K.;
Synthetic chromogenic substrates in the assay for plasma
prekallikrein and coagulation factors II and X
In: Chromogenic Peptide Substrates; hrsg. von M.F. Scully
and V.V. Kakkar; Vlg. Churchill Livingstone 1979
21. Forbes, C.D.; Pensky, J.; Ratnoff, O.D.;
Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma
thromboplastin antecedent by purified serum C1-inactivator
J. Lab. Clin. Med.; November 1970, Vol. 76, No. 5, 809-815
22. Gallin, J.I.; Kaplan, A.P.;
Mononuclear Cell Chemotactic Activity of Kallikrein and
Plasminogen Activator and its Inhibition by C1-Inhibitor and
alpha-2-Macroglobulin
Journal of Immunology 113, 1928, (1974)
23. Gigli, I.; Mason, J.W.; Colman, R.W.; Austen, K.F.;
Interaction of Plasma Kallikrein with the C1-Inhibitor
The Journal of Immunology Vol. 104, No.3, March 1970, 574-581

24. Gigli I.; Ruddy, S.; Austen, K.F.;

The stoichiometric measurement of the serum inhibitor of the first component of complement by the inhibition of immune hemolysis

The Journal of Immunology Vol. 100, No. 6 1968 1154-1164

25. Gitlin, D.; Biasucci, A.;

Development of gamma-G, gamma-A, gamma-M, beta2C/beta1A, C1 Esterase Inhibitor, Ceruloplasmin, Transferrin, Hemopexin, Haptoglobin, Fibrinogen, Plasminogen, alpha-1-Antitrypsin, Orosomucoid, beta-Lipoprotein, alpha-2-Macroglobulin and Prealbumin in the Human Conceptus

J. Clin. Invest. 48, 1433-1446 (1969)

26. Grabar, P.; Williams, C.A.;

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin

Biochim. Biophys. Acta 10, 193 (1953)

27. Hadjinnaki, K.; Lachman, P.J.;

Hereditary angio-oedema a review with particular reference to pathogenesis and treatment

Clin. Allergy 1, 1971, 221-233

28. Hamilton, P.J.; Stalker, A.L.; Douglas, A.S.;

Disseminated intravascular coagulation: a review

Journal of Clinical Pathology, 1978, 31, 609-619

29. Harpel, P.C.;

A sensitive colorimetric method for the measurement of serum C1-inactivator using the substrate N-alpha-acetyl-L-lysine methyl ester

J. Immunology 104: 1024-1030 (1970)

30. Harpel, P.C.;

C1-inactivator inhibition by plasmin

J. Clin. Invest. 49: 568-575 (1970)

31. Harpel, P.C.; Cooper, N.R.;
Studies on Human Plasma C1 Inactivator-Enzyme Interactions
I. Mechanisms of Interaction with C1s, Plasmin, and Trypsin
The Journal of Clinical Invest., Vol. 55, March 1975
593-604
32. Harpel, P.C.; Hugli, T.E.; Cooper, N.R.;
Studies on Human Plasma C1 Inactivator-Enzyme Interactions
II. Structural Features of an abnormal C1 inactivator from a
kindred with hereditary angioneurotic edema
The Journal of Clinical Investigation, Volume 55 March 1975
605-611
33. Haupt, H.; Heimburger, N.; Kranz, T.; Schwick, H.G.;
Ein Beitrag zur Isolierung und Charakterisierung des
C1-Inaktivators aus Humanplasma
Eur. J. Biochem. 17: 254-261 (1970)
34. Heimburger, N.;
Infektion und Blutgerinnung aus immunologischer Sicht
in: Infektion, Blutgerinnung u. Hämostase
Hrsgb. R. Marx und H.A. Thies S.77-82 (1977)
35. Highsmith, R.F.; Burnett, C.J.; Weirich, C.J.;
The interaction of C1-esterase inhibitor and plasmin in
human euglobulin
J.Lab.Clin.Med. March 1979 459-471 93:459
36. Johnson, A.M.; Alper, C.A.; Rosen, F.S.; Craig, J.M.;
C1-Inhibitor: evidence for decreased hepatic synthesis in
hereditary angioneurotic edema
Science (Washington), 163, 286
37. Kabi - Diagnostica
S-2302 Determination of Prekallikrein in Plasma
Informationsschrift der Kabi-Diagnostica, Stockholm
38. Kagen, L.J.; Becker, E.L.;
Inhibition of permeability globulins by C1-esterase inhibitor
Fed. Proc. 22: 613, (1963)

39. Kaplan, A.P.;
The Hageman Factor Dependent Pathways of Human Plasma
Microvascular Research 8, 97-111 (1974)
40. Kaplan, A.P.; Kay, A.B.; Austen, K.F.;
A prealbumin activator of prekallikrein.
III. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils
by the conversion of human prekallikrein to kallikrein
J. Exp. Med. 135, 81
41. Kellermeyer, R.W.; Graham, R.C. Jr.;
Kinins - Possible Physiologic and Pathologic Roles in Man
New Engl. Journ. Med. 279,754, (1968)
42. Kleinberger, G.; Lechner, K.; Pichler, M.; et alii;
Gerinnungsstörungen beim akuten Leberversagen und ihre
Substitution
Infusionstherapie 6: 137-141 (1979)
43. Klingemann, H.-G.; Schmidt, U.; et alii;
Störungen der Blutgerinnung bei Leberzirrhose in Beziehung
zum Ausmaß der portalen Hypertension
Fortschr. Med. 98. Jg. (1980), Nr. 40 1561-1566
44. Kluft, C.; Trumpf-Karlshoven, M.M.; Jie, A.F.H.;
Crucial conditions for the determination of prekallikrein
levels in plasma with chromogenic substrates
In: Chromogenic Peptide Substrates; hrsg. von M.F. Scully
and V.V. Kakkar; Vlg: Churchill Livingstone 1979,
45. Kourilsky, O.; Leroy, C.; Peltier, A.P.;
Complement and Liver Cell Function in 53 Patients with
Liver Disease
The American Journal of Medicine, Vol. 55, 783-790 (1973)

46. Lachmann, P.J.; Wragge-Morley, J.;
C1 Inhibitor in Malignant Diseases
Lancet, March 27, 1976; 703-704
47. Laurell, C-B.;
Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in
Agarose Gel Containing Antibodies
Analytical Biochemistry 15, 45-52 (1966)
48. Laurell, C-B.;
Antigen-Antibody Crossed Electrophoresis
Anal. Biochem., 10, 358, (1965)
49. Lepow, I.H.; Leon, M.A.;
Interaction of a serum inhibitor of C1 Esterase with
intermediate complexes of the immune haemolytic system
I. Specificity of inhibition of C1 activity associated with
intermediate complexes
Immunology 5, 1962, 222
50. Levy, L.R.; Lepow, I.H.;
Assay and Properties of Serum Inhibitor of C1-Esterase
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1959; 101, 608-611
51. Mason, J.W.; Kleeberg, U.; Dolan, P.; Colman, R.W.;
Plasma Kallikrein and Hageman Factor in Gram-Negative
Bacteremia
Ann. of Internal Medicine 73:545-551, 1970
52. Meier, H.L.; Pierce, J.V.; Colman, R.W.; Kaplan, A.P.;
Activation and Function of Human Hageman Factor
The Journal of Clinical Investigation, Vol.60, July 1977
18-31
53. Mobarhan, S.; Gajewski, J.; Grace, N.; Greenberg, M.; Iber, F.;
Gurewich, V.;
Association of consumption coagulopathy with bleeding in
cirrhosis
Clin. Res. 19, 399, (1971)

54. Müller-Berghaus, G.;
Pathogenese der Blutgerinnungsstörungen bei Sepsis
in: Infektion, Blutgerinnung und Hämostase
Hrsg. R. Marx und H.A. Thies S. 215-220 (1977)
55. Nagaki, K.; Inai, S.;
Inactivator of the first component of human complement
(C1 INA). Enhancement of C1 INA activity against C1s by
acidic mucopolysaccharides
Int. Archs. of Allergy appl. Immunology 50, (1976) 172-180
56. Neurath, H.; Schwert, G.W.;
The mode of action of the crystalline pancreatic enzymes
Chemical Reviews 46 69 (1950)
57. Ødegard, O.R.; Lie, M.;
On Use of Chromogenic Substrates for Studies of Coagulation
Inhibitors
Hämostasis 7: 121-126 (1978)
58. Özge-Anwar, A.H.; Movat, H.Z.; Scott, J.G.;
The kinin system of human plasma. IV: The interrelationship
between the contact phase of blood coagulation and the
plasma kinin system in man
Thromb. Diath. Haemorrh., 27, 1972, 141
59. Østher, K.;
C1-Inactivator from Cancer Cells
The Lancet, March 2, 1974; 359-360
60. Philapitsch, A.; Popov-Cenic, S.;
Pilotuntersuchungen von Inhibitoren, Inhibitionswirkungen und
Aktivierbarkeiten in Plasmen während der Herz-Lungen-Maschine
Verhandlungsbericht der 25. Tagung der Deutschen Arbeitsge-
meinschaft für Blutgerinnungsforschung in München
Februar 1981; Schattauer Verlag

61. Potter, B.J.; Elias, E.; Fayers, P.M.; Jones, E.A.;
Profiles of Serum Complement in Patients with
Hepatobiliary Diseases
Digestion 18: 371-383 (1978)
62. Potter, B.J.; Trueman, A.M.; Jones, E.A.;
Serum complement in chronic liver disease
Gut, 1973, 14, 451-456
63. Rapaport, S.I.; Chapman, C.G.;
Coexistent Hypercoagulability and Acute Hypofibrinogenemia
in a Patient with Prostatic Carcinoma
Am. J. Med. 27: 144-153, 1959
64. Ratnoff, O.D.; Naff, G.B.;
The conversion of C1s to C1-esterase by plasmin and trypsin
J. exp. Med. 125, 337 (1967)
65. Ratnoff, O.D.; Pensky, J.; Ogston, D.; Naff, G.B.;
The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma
permeability factor, and the C1r subcomponent of the first
component of complement by serum C1-esterase inhibitor
J. exp. Med. 129, 315, (1969)
66. Ressler, N.;
Clin. Chim. Acta 5, 795 (1960)
67. Robinson, J.A.; Klodnycky, M.L.; Loeb, H.S.; Racic, M.R.;
Gunnar, R.M.;
Endotoxin, Prekallikrein, Complement and Systemic Vascular
Resistance
Amer. J. Med. 59, 61-67 (1975)
68. Roka, L.;
Infektion und Blutgerinnung aus biochemischer Sicht
in: Infektion, Blutgerinnung und Hämostase
Hrsgb. R. Marx und H.A. Thies s. 45-53 1977

69. Samaha, R.J.; Bruns, T.N.C.; Ross, G.J.;
Chronic Intravascular Coagulation in Metastatic Prostate
Cancer
Arch. Surg. Vol. 106, March 1973, 295
70. Schena, F.P.; Manno, C.; et alii;
A kinetic Test for the Assay of the C1 Esterase-Inhibitor
J. Clin. Chem. Clin. Biochem.; Vol. 18, 1980, pp. 17-21
71. Schindera, F.; Rother, U.; Hufnagel, Chr.;
Hereditäres angioneurotisches Ödem
Helv. paediat. Acta 33, 259-266 (1978)
72. Schramm, W.;
Zur Diagnostik und Therapie thrombophiler Diathesen
Habilitationsschrift; München 1981
73. Schramm, W.; Penker, W.;
C1-Inaktivator bei thrombophilen Diathesen
Verhandlungsbericht der 25. Tagung der Deutschen Arbeitsgemein-
schaft für Blutgerinnungsforschung in München
Februar 1981; Schattauer Verlag
74. Schramm, W.; Rupp, P.; Duswald, K.H.;
PNEUMONIEN - gerinnungsphysiologische Parameter und
therapeutische Möglichkeiten
In: Lunge, Blutgerinnung und Hämostase. XXIV. Hamburger
Symposion über Blutgerinnung am 19. und 20. Juni 1981.
Verlag: F.K. Schattauer
75. Schreiber, A.D.; Kaplan, A.P.; Austen, F.;
Inhibition by C1 INH of Hageman Factor Fragment Activation
of Coagulation, Fibrinolysis, and Kinin Generation
The Journal of Clinical Investigation Volume 52
June 1973 1402-1409

76. Sharma, D.B.; Bhargava, V.; Berry, A.M.; Ghosh, S.;
Consumptive Coagulopathie in Typhoid Fever
Indian Journal of Pediatrics Vol. 39, No. 298, 375 (1972)
77. Sherry, S.; Troll, W.;
The action of thrombin on synthetic substrates
Journal of Biological Chemistry 208; 95 (1954)
78. Siegal, T.; Seligsohn, U.; Aghai, E.; Modan, M.;
Clinical and Laboratory Aspects of Disseminated Intra-
vascular Coagulation (DIC): A Study of 118 Cases
Thrombos. Haemostas. (Stuttg.) 1978, 39, 122-134
79. Smith, A.; Thompson, R.;
A method for the estimation of the activity of the inhibitor
of the first component of complement
J. Clin. Pathol. 1980; 33; 167-170
80. Soria, J.; Soria, C.; Boisseau, M.R.; Hourdille, P.;
Sanchez, G.;
Measurement of prekallikrein. Clinical application to patients
suffering from burns, and the relationship between platelet
nucleotides and prekallikrein level
In: Chromogenic Peptide Substrates; hrsg. von M.F. Scully and
V.V. Kakkar; Vlg: Churchill Livingstone 1979
81. Steinbuch, M.;
Beziehungen zwischen bakteriellen Exo- und Endotoxinen und der
Blutgerinnung
in: Infektion, Blutgerinnung und Hämostase
Hrgb. R. Marx und H.A. Thies S. 55-75 1977
82. Stormorken, H.; et alii;
A chromogenic substrate assay for plasma prekallikrein with
a note on the site of biosynthesis
Haemostasis 7 69-75, (1978)

83. Svendsen, L.;
Standardization of Chromogenic Synthetic Peptide Substrates
for Proteolytic Enzymes
Hämostasis 7: 97 (1978)
84. Svendsen, L.; Stocker, K.;
Determination of Protease Activities with Specifically
Constructed Peptide-p-Nitroanilide Derivatives
I. Witt: New Methods for the Analysis of Coagulation
Using Chromogenic Substrates. Vlg. de Gruyter 1977 S. 23-35
85. Swert, G.W.; Neurath, H.; Kaufman, S.; Suoke, J.D.;
The specific esterase activity of trypsin
Journal of Biological Chemistry 172; 221 (1948)
86. Teger-Nilsson, A.C.;
Use of chromogenic substrates for screening of inhibitors of
coagulation and fibrinolysis in patients
In: Chromogenic Peptide Substrates; hrsg. von M.F. Scully and
V.V. Kakkar; Vlg: Churchill Livingstone 1979, S. 269
87. Thaler, E.; Kleinberger, G.;
Sepsis und Blutgerinnung
Intensivmed. 16, 54-60 (1979)
88. Tomar, R.H.; Kolchins, D.;
Complement and Coagulation
Thromb. Diath. Haemorrhag.: 27, 388-395; 1972
89. Troll, W.; Sherry, S.;
The action of plasmin on synthetic substrates
Journal of Biological Chemistry 208; 85 (1954)
90. Verstraete, M.; Vermeylen, J.; Collen, D.;
Intravascular Coagulation in Liver Disease
Ann. Rev. Med. 25, 477-455, (1974)

91. Witte, J.; Schiessler, H.; Scherer, R.; Jochum, M.;
Schramm, W.; Fritz, H.;
Hyperdynamer septischer Schock des Menschen: Konzentrations-
verlauf von ausgewählten Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteinen
Chirurgisches Forum '79 für experimentelle und klinische
Forschung. Supplement 1979 zu Langenbecks Archiv für Chirurgie
vereinigt mit Bruns' Beiträge für Klinische Chirurgie.
Herausg. H. Junghanns, Springer-Verlag 1979 S. 54-59
92. Wong, P.; Colman, R.W.; Talamo, R.; Babior, R.M.;
Kallikrein-bradykinin system in chronic alcoholic liver
disease
Ann. Int. Med., 77: 205-209 (1972)
93. Zimmerman, T.S.; Mueller-Eberhard, H.J.;
Blood Coagulation initiation by a complement-mediated
pathway
J. exp. Med. 134: 1601 (1971)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Schramm für die freundliche Überlassung des Themas und die jahrelange Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Gedankt sei auch allen Mitarbeitern der Hämostaseologischen Abteilung, insbesondere Frä. Anna Hadinger, für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich Frä. Renate Bauer für das äußerst sorgfältige Anfertigen dieser Dissertationsschrift.

Lebenslauf

Am 16.01.1957 wurde ich, Luitpold Wolfgang Penker in Moosburg geboren.

- | | |
|-------------|---|
| 1963 - 1967 | Besuch der Volksschule in Moosburg |
| 1967 - 1976 | Besuch des Josef-Hofmiller-Gymnasiums in Freising |
| 1976 | Abitur |
| 1976 - 1977 | Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München |
| 1977 - 1983 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München |
| 1983 | 15. April: 3. Teil des Staatsexamens
27. April: Approbation als Arzt |
| 1979 - 1983 | Durchführung der Doktorarbeit bei
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Schramm |

